



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYUŽITÍ FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH ANALÝZ PŘI STUDIU  
STRESOVÝCH ODPOVĚDÍ MIKROORGANISMŮ**

UTILIZATION OF PHYSICO-CHEMICAL ANALYSES IN STUDY ON MICROBIAL STRESS-RESPONSE

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Eva Slaninová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

**BRNO 2016**



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0963/2015</b>	Akademický rok: <b>2015/2016</b>
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	<b>Bc. Eva Slaninová</b>	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Petr Sedláček, Ph.D.</b>	
Konzultanti:		

### Název diplomové práce:

Využití fyzikálně-chemických analýz při studiu stresových odpovědí mikroorganismů

### Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši na zadané téma.
2. Na základě literární rešerše zvolit vhodné metody fyzikálně-chemické analýzy buněk, relevantní při studiu jejich reakce na vybrané stresové podmínky.
3. Navrhnout a realizovat sérii experimentů s využitím vybraných metod.

### Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Eva Slaninová  
Student(ka)

-----  
Ing. Petr Sedláček, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá využitelností fyzikálně-chemických analýz při vlivu stresových faktorů na mikroorganismy, kde hlavní náplní této práce bylo navržení a následná optimalizace technik a metod, které jsou obecně využívány v odlišných oblastech vědy a výzkumu. Jako modelové mikroorganismy, podrobené fyzikálně-chemickým analýzám v experimentální části této práce, byly zvoleny dva bakteriální kmeny: *Cupriavidus necator* H16 a její mutantní kmen *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup> lišící se schopností produkce polyhydroxyalkanoátů. Nejprve byly navrženy a otestovány mikroskopické techniky jako transmisní elektronová mikroskopie (TEM), kryo skenovací elektronová mikroskopie (kryo-SEM) a mikroskopie atomárních sil (AFM) sloužící k charakterizaci morfologických odlišností bakterií. Dále byly stanovovány a porovnávány viskoelastické vlastnosti bakterií prostřednictvím oscilačních testů metodou reologie, které byly rovněž otestovány a optimalizovány s ohledem na typ vzorků. Mezi další navržené a otestované fyzikálně-chemické metody patří termická analýza, konkrétně diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) a termogravimetrická analýza (TGA) zabývající se transportem vody a chování intracelulární vody s ohledem na vliv přítomných PHB granulí v bakteriích. Poslední technika, která byla zavedena a optimalizována, je použití dynamického a elektroforetického rozptylu při měnícím se pH, sloužící k charakterizaci povrchových vlastností bakterií (velikost, zeta potenciál, izoelektrický bod).

## ABSTRACT

This diploma thesis deals with the utilization of physico-chemical analysis in study on microbial stress-response. The main content of this work was to propose and optimize techniques and methods which are generally used in different industries. Two bacterial strains, *Cupriavidus necator* H16 and its mutant strain *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup> producing polyhydroxyalkanoates (PHA) under certain conditions, were used as model microorganisms. Initially, microscopic techniques such as transmission electron microscopy (TEM), cryo scanning electron microscopy (cryo SEM) and atomic force microscopy (AFM) were proposed and tested for the characterization of morphological differences of bacteria. Furthermore, viscoelastic properties of bacteria were determined and compared by the oscillatory tests of the rheology method considering another type of samples. Thermal analysis methods, differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA) in particular, focused on water transport and behavior of intracellular water influenced by presence of the granules of PHB in bacteria. The last technique, utilized in the study, was dynamic and electrophoretic light dispersion during pH changes for characterization of the surface properties of bacteria such as size, zeta potential and the isoelectric point.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

*Cupriavidus necator*, polyhydroxyalkanoáty, elektronová mikroskopie, mikroskopie atomárních sil, reologie, termická analýza, rozptyl světla

## **KEYWORDS**

*Cupriavidus necator*, polyhydroxyalkanoates, electron microscopy, atomic force microscopy, rheology, thermal analysis, light scattering

SLANINOVÁ, E. *Využití fyzikálně-chemických analýz při studiu stresových odpovědí mikroorganismů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 73 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
Bc. Eva Slaninová

## Poděkování:

*Chtěla bych především poděkovat svému vedoucímu mé diplomové práce Ing. Petru Sedláčkovi Ph.D. za odborné vedení práce, poskytnuté materiály, ochotu, čas a cenné rady potřebné pro vypracování diplomové práce. Další velké poděkování patří doc. Ing. Stanislavu Obručovi Ph.D. za poskytnutí osobních konzultací a za pomoc při řešení experimentální části. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Jiřímu Smilkovi Ph.D., Ing. Pavle Benešové, Ing. Danu Kučerovi a Ing. Tereze Pilgrové za pomoc při osvojování experimentálních technik a poskytnutí cenných konzultací.*

## OBSAH

<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Voda a její unikátní vlastnosti .....</b>	<b>10</b>
2.1.1 Vodíková vazba a molekulární struktura vody .....	10
2.1.2 Struktura vody v kapalně fázi .....	13
2.1.3 Struktura ledu.....	14
2.1.4 Vliv vody na konformace makromolekul .....	14
2.1.5 Voda v buňkách .....	16
<b>2.2 Kryobiologie.....</b>	<b>17</b>
2.2.1 Přeměna vody na led .....	17
2.2.2 Osmotické důsledky mražení buněk .....	18
2.2.3 Vliv nízkých teplot na intracelulární a extracelulární vodu.....	19
2.2.4 Principy růstu intracelulárních krystalizačních zárodků.....	19
2.2.5 Vliv rychlosti chlazení .....	20
2.2.6 Kryoprotektivní aditiva.....	22
2.2.7 Vliv rychlosti zpětného zahřívání buněk .....	24
<b>2.3 Modelové mikroorganismy - <i>Cupriavidus necator</i>.....</b>	<b>25</b>
2.3.1 Výskyt a vlastnosti bakterie .....	25
2.3.2 Stresová odpověď bakterií .....	26
2.3.3 Struktura a vlastnosti polyhydroxyalkanoátů.....	27
<b>2.4 Studium struktury a vlastností poly(3-hydroxybutyrátu) z hlediska kryoprotektivních účinků .....</b>	<b>29</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Použité bakterie, chemikálie a přístroje.....</b>	<b>32</b>
3.1.1 Použité bakterie.....	32
3.1.2 Chemikálie ke kultivaci mikroorganismů .....	32
3.1.3 Přístrojové vybavení .....	32
<b>3.2 Kultivace .....</b>	<b>33</b>
3.2.1 Skladování bakteriálních kultur a příprava inokula .....	33
3.2.2 Živná média .....	33
<b>3.3 Charakterizace morfologických odlišností bakterií prostřednictvím mikroskopických technik.....</b>	<b>34</b>

3.3.1	Transmisní elektronová mikroskopie.....	34
3.3.2	Kryo skenovací elektronová mikroskopie .....	35
3.3.3	Mikroskopie atomárních sil .....	35
<b>3.4</b>	<b>Stanovení mechanických vlastností bakteriálních kmenů .....</b>	<b>36</b>
<b>3.5</b>	<b>Studium intracelulární vody metodami termické analýzy .....</b>	<b>36</b>
3.5.1	Diferenční skenovací kalorimetrie .....	36
3.5.2	Termogravimetrická analýza .....	36
<b>3.6</b>	<b>Charakterizace povrchových vlastností bakterií rozptylovými technikami.....</b>	<b>37</b>
3.6.1	Dynamický a elektroforetický rozptyl světla .....	37
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Porovnání mikroskopických metod .....</b>	<b>38</b>
4.1.1	Transmisní elektronová mikroskopie.....	38
4.1.2	Kryo skenovací elektronová mikroskopie .....	38
4.1.3	Fluorescenční mikroskopie .....	40
4.1.4	Mikroskopie atomárních sil .....	41
<b>4.2</b>	<b>Stanovení a porovnání viskoelastických vlastností .....</b>	<b>43</b>
4.2.1	Reometrická měření .....	43
<b>4.3</b>	<b>Termická analýza .....</b>	<b>50</b>
4.3.1	Diferenční skenovací analýza .....	50
4.3.2	Termogravimetrická analýza .....	52
<b>4.4</b>	<b>Stanovení distribuce velikosti částic a zeta potenciálu .....</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>68</b>
<b>7.1</b>	<b>Použité zkratky .....</b>	<b>68</b>
<b>7.2</b>	<b>Použité symboly .....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>70</b>

# 1 ÚVOD

Už před více než sto lety Louis Pasteur, francouzský chemik a zakladatel mikrobiologie a lékařské imunologie, prohlásil: „A stejně jsou to mikrobi, kdo bude mít poslední slovo!“. A není divu. Bakterie jakožto mikroorganismy na Zemi všudypřítomné a úspěšně přežívající v oblastech od polárního až k tropickému pásu, musí ve svém přirozeném prostředí čelit mnoha různorodým podmínkám. Jeden z klíčových důvodů jejich tak hojného výskytu je dobrá snášenlivost rozmanitých stresů.

Například rychlé změny teplot mají obrovský vliv na strukturu a biologickou aktivitu mikroorganismů resp. buněk obecně. Mohlo by se zdát, že dopady změny teplot jsou vůči buňkám obecně negativní až letální, avšak v praxi je kupříkladu často využíváno zmrazení buněk, tkání nebo celých životaschopných orgánů za účelem jejich konzervace (kryokonzervace), přičemž k dlouhodobému uchovávání se běžně využívá lyofilizace (mrazová vakuová sublimace). Jiným příkladem praktického využití efektu změny teploty na buňku je narušení celistvosti buněk v rámci tzv. kryolipolýzy, která se využívá jako nová metoda hubnutí.

Jeden z dalších univerzálních stresových faktorů je změna nebo kolísání hodnoty pH, která má mimo jiné výrazný vliv na metabolismus buněk, konkrétně na protonaci a deprotonaci ovlivňující konformaci bílkovin a samozřejmě tím i aktivitu enzymů. Disociace molekul, která je také přímo ovlivněna okolním pH, ovlivňuje také jejich transport přes membrány, kdy molekula získá či ztrácí schopnost samovolné difúze. Další z mnoha obecných stresových faktorů představuje narušení osmotické rovnováhy, kdy koncentraci rozpuštěných látek v prostředí tolerují mikroorganismy jen do určité míry. Samozřejmě různé kmeny bakterií jsou tolerantní vůči koncentraci rozpuštěných látek ve vodném roztoku odlišně.

Výše uvedené a mnohé další fyzikálně-chemické stresové faktory naznačují, proč je vhodné se zaměřit na vliv stresových podmínek nejenom z biologického hlediska, ale i pohledem fyzikálně-chemických metod. Právě fyzikálně-chemické metody jsou dlouhodobě využívány k charakterizaci vlastností vody a vodných roztoků za rozličných podmínek, představují osvědčený instrumentální aparát při popisu fázových přechodů a rovnováh ve vodných disperzích, při studiu hydratace molekul a povrchů a v mnoha dalších podobně zaměřených oblastech.

Jelikož bakterie mohou obsahovat až 70% svého celkového objemu v podobě vodného roztoku, transport vody do nebo ven z buňky, případně změna skupenství vody se odrazí nejen na změně různých parametrů intracelulárního prostředí, ale také na samotném tvaru a velikosti buněk. Z tohoto důvodu byly v rámci experimentální části předložené práce porovnány různé mikroskopické techniky pro bližší prozkoumání a charakterizaci morfologie mikroorganismů a jejich změn. S morfologickými změnami mikroorganismů rovněž souvisí i změny jejich mechanických vlastností, kdy příčiny těchto změn mohou souviset s mírou hydratace nebo s množstvím vody vyskytující se v intracelulárním prostoru a jejich důsledky (např. schopnost odolávat mechanické deformaci) mohou mít přímý dopad na stresovou odpověď organismu. Přežití bakterií vystavených různým stresujícím podmínkám tak závisí mnohdy na míře



odolnosti vůči mechanickému namáhání. Další metoda navržená pro studium stresové odpovědi mikroorganismů v rámci této diplomové práce je termická analýza, která může poskytnout zásadní informace ohledně chování bakterií při zahřívání či mrznutí prostřednictvím popisu fázových přechodů vody v buňkách. Tato metoda je též vhodná ke studiu transportu vody, např. přes buněčnou stěnu.

Cílem a hlavní experimentální náplní předložené diplomové práce bylo ověřit využitelnost fyzikálně-chemických metod při vlivu stresových faktorů na mikroorganismy, a to včetně zavedení a optimalizace techniky a metod, dosud využívaných zpravidla pro jiné typy vzorků. Jednou z takových, která byla zavedena a otestována, je použití dynamického a elektroforetického rozptylu, který se běžně využívá k charakterizaci koloidních vlastností například pro proteiny nikoli pro celé mikroorganismy. Všechny navržené a testované techniky se zaměřují převážně na strukturu a fyzikálně-chemické parametry intracelulární vody, proto je také rešeršní úvod práce věnován převážně unikátním vlastnostem vody, neboť, jak prohlásil Albert Szent-Gyorgy, maďarský nositel Nobelovy ceny za medicínu: „Molekulární struktura vody je podstatou všeho života...“

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Voda a její unikátní vlastnosti

Voda se vyznačuje velmi unikátními vlastnostmi, ať už se vyskytuje v plynném, kapalném či pevném stavu. První zvláštností týkající se vody je její hustota, jelikož kapalná voda má větší hustotu nežli voda v tuhé fázi. Maximální hustoty kapalná fáze dosahuje při 4 °C [1]. Dále má voda v porovnání s jejími analogy z periodické tabulky, tj. s hydridy prvků IV.A a VII. A skupiny, ojedinělé teploty tání a varu. Například sulfan má bod varu –60 °C a voda má 100°C. Také bod tání se velice liší, sulfan má bod tání –86 °C a voda 0 °C [2].

Mezi další abnormality patří velká tepelná kapacita, která činí  $4180\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$  a vysoká tepelná vodivost. V kombinaci s vysokým výskytem v organismu přispívá voda k regulaci tělesné teploty a zabraňuje tak kolísáním lokálních teplot. Omezuje také dehydrataci a chlazení organismu odpařením prostřednictvím vysokého skupenského tepla vypařování vody. Důležitost této jedinečné vlastnosti se projevuje vzhledem k hydrataci důležitých biologických makromolekul, konkrétně nukleových kyselin a proteinů, kde jejich trojrozměrná struktura a tím i jejich správná biologická funkce je podmíněna právě dostatečnou hydratací.

S vysokou dielektrickou konstantou vody zase souvisí její znamenitá schopnost rozpouštět ionty solí. Díky této vlastnosti voda disponuje schopností rozpouštět širší rozsah látek nežli jiná kapalná fáze. I proto voda představuje univerzální rozpouštědlo a transportní médium živých organismů, a to z hlediska hospodaření s rozličnými látkami, od esenciálních biochemických reagentů až po odpadní látky metabolismu [3].

Kromě toho je voda jako jedna z mála kapalin schopna autoionizace. Autoionizační reakce patří mezi vratné reakce, kde se vzniklé ionty ve zlomku vteřiny rekombinují. Voda tak ionizuje a usnadňuje výměnu protonů mezi molekulami [1]. K posledním anomáliím vody, které budou ještě zmíněny, spadá povrchové napětí. Povrchové napětí vody je výrazně vysoké a činí  $73\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ve srovnání například s benzenem, kde je hodnota povrchového napětí méně než poloviční. Pozoruhodné rozdíly vlastností jsou rovněž patrné u porovnání chování horké vody a vody při velmi nízkých teplotách, tj. v případě podchlazené vody a hexagonálního ledu. Jakmile se zahřeje podchlazená voda, jednotlivé molekuly vody se zmenší a dojde tak ke smrštění velkého množství vody. V důsledku toho, se voda stává více odolná vůči kompresi, index lomu se zvyšuje, plyny se méně rozpouštějí, lépe se ohřívá a má větší tepelnou vodivost. Naproti tomu, horká voda vykazuje opačné vlastnosti nežli voda podchlazená, zamrzne dokonce i rychleji na rozdíl od vody studené.

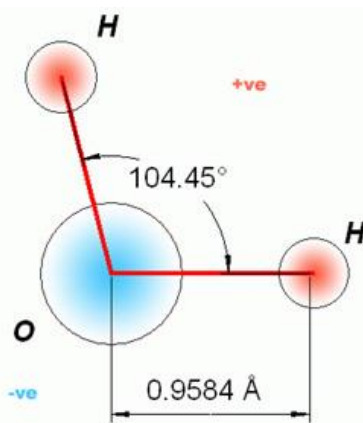
Díky velkému počtu anomálií vody zde byly zmíněny pouze ty nejznámější. Obecně se dá říci, že prakticky všechny jedinečné vlastnosti vody vycházejí z její molekulární struktury [3]. Té se proto věnuje následující podkapitola.

#### 2.1.1 Vodíková vazba a molekulární struktura vody

Více než dva tisíce let, od dob Thalese z Milétu (490 – 430 př. n. l.), byla voda považována za základní element, z něhož je tvořen svět kolem nás. Představa o nedělitelnosti vody byla popřena až koncem 18. století, kdy francouzský chemik Lavoisier pomocí průchodu páry

rozzhavenou hlavní pušky rozložil vodu na vodík a kyslík. Ve stejném období bylo také dokázáno, že lze vodu syntetizovat zapálením vodíku za přítomnosti kyslíku. Roku 1814 byl Daltonem předpovězený látkový poměr vodíku a kyslíku 1:1 upraven chemikem Berzelieusem na 2:1. Tento chemik také zavedl označení  $\text{H}^2\text{O}$  pro vodu, který se už velmi podobá dnešnímu značení vody  $\text{H}_2\text{O}$  [2].

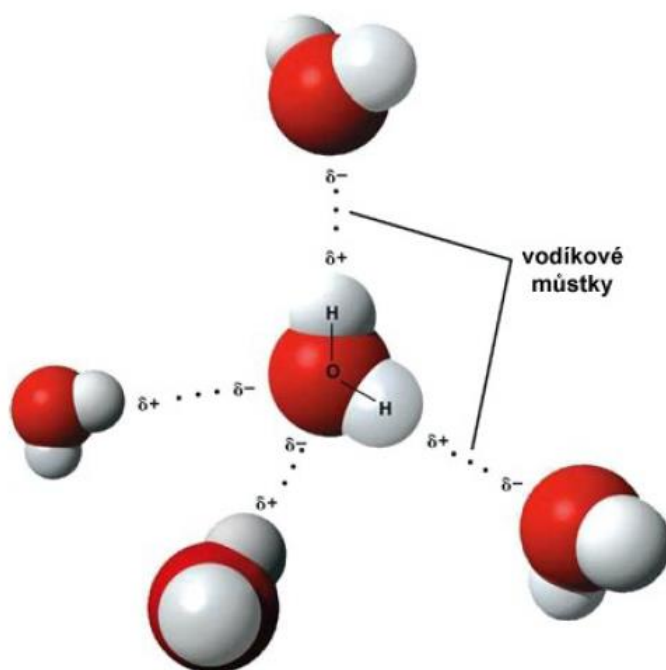
Přestože molekula vody obsahuje ve své struktuře pouze tři atomy, vykazuje oproti jiným molekulám podobného typu (např.  $\text{CO}_2$ ) zajímavou geometrii. Pomocí infračervené a Ramanovy spektroskopie byl tvar molekuly vody určen jako prostorový čtyřstěn, kde se kyslík nachází uprostřed, a dva vodíky se dvěma volnými elektronovými páry v rozích čtyřstěnu [2]. Vzdálenost dvou vodíků v molekule vody činí  $1,54 \text{ \AA}$ , u kyslíku s vodíkem je vzdálenost rovna  $0,96 \text{ \AA}$ . Sloučením valenčních elektronů kyslíku a vodíků vznikly dvě kovalentní vazby O-H a mezi nimi úhel o  $104,45^\circ$  viz Obrázek 1. Tento úhel je velmi blízký vnitřnímu úhlu  $109^\circ$  tetraedru. Díky distribuci atomů vodíků a kyslíku v molekule vody, kde kyslík přitahuje svými volnými elektronovými páry ve vrcholech tetraedru elektronovou hustotu vodíků, vznikají dva kladně nabitě vrcholy tetraedru a dva záporně nabitě [4,5]. Molekula vody se tak navenek chová jako dipól, hodnota dipólového momentu je rovna 1,9 Debye, což v kombinaci s malou velikostí dává molekule vody výrazně polární charakter [6].



**Obrázek 1** Molekulová struktura s naznačeným dipólovým momentem [7].

V důsledku elektrostatické přitažlivosti vzniká mezi vodíkem a kyslíkem vodíková vazba (H-vazba). H-vazba náleží mezi slabé nekovalentní interakce (6-8 kcal/mol) na rozdíl například od kovalentní vazby mezi dvěma uhlíky C-C (145 kcal/mol) [2]. Nejčastější typ této vazby se vyznačuje atomy s vysokou elektronegativitou a volným elektronovým párem, kde je atom vodíku kovalentně vázán na jeden z nich (fluor, kyslík nebo dusík). Prodloužení H-vazby přitom koreluje se silou vodíkové vazby a také tu dochází k přenosu elektronu z protonového akceptoru na protonový donor [8]. Existují také H-vazby, kde je protonovým akceptorem systém s delokalizovanými elektrony jako například benzen.

Prostřednictvím infračervené spektroskopie byl zjištěn posun spektra, který náleží valenční vibraci vazby X-H k delším vlnovým délkám. Tento posun je označován za tzv. *červený posun*, s posunem dochází i k zesílení intenzity infračerveného spektra. Tento jev se vyskytuje u všech tří fází vody. Díky vlastnostem H-vazeb, se červený posun využívá jako otisk prstů. Nicméně, existují i výjimky, kde dochází k posunu infračerveného spektra na opačnou stranu, H-vazby se zkracují, vzrůstá frekvence a klesá intenzita. Jedná se o tzv. *modrý posun*. Pro skupinu vazeb s těmito odlišnostmi se začalo v odborné literatuře používat název *nepravá vodíková vazba* [9,10]. V současné době byl objeven další typ H-vazby pomocí rentgenostrukturních studií, konkrétně dvouvodíková vazba  $Y-H\cdots H-M$ , kde Y je elektronegativní atom a M je atom kovu. Principem dvouvodíkové vazby je, že jeden atom vodíku se váže s elektronegativním prvkem a získá tím kladný náboj, druhý atom vodíku se váže s elektropozitivním prvkem a získá tím záporný náboj. Tudíž jeden vodík nese záporný náboj, druhý kladný náboj a dochází tak k elektrostatickému přitahování mezi oběma zpolarizovanými atomy vodíku. Tento typ H-vazby objasnil například vysoký bod varu dimeru  $H_3BNH_3$ . Tuto vazbu můžeme také nalézt při interakci karboranů a biomakromolekul [10,11].



**Obrázek 2** Mezimolekulové vodíkové vazby molekul vody [10].

### 2.1.2 Struktura vody v kapalné fázi

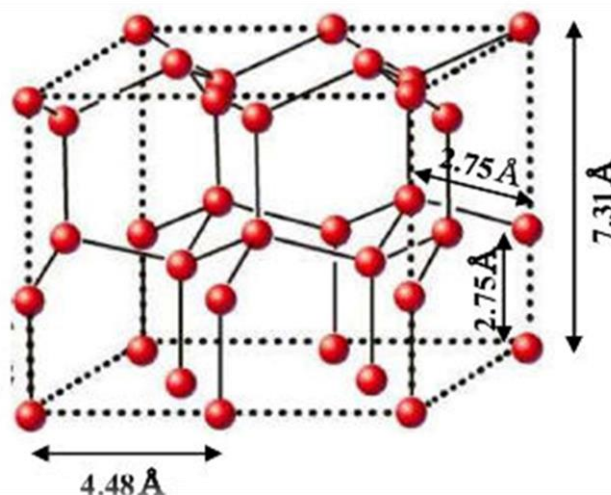
Struktura vody v kapalné fázi má několik pravděpodobných generalizací. Samotná molekula vody se váže pomocí čtyř H- vazeb k dalším čtyřem molekulám vody viz Obrázek 2 [3]. Avšak v okolí molekuly vody se předpokládá přítomnost spíše 4,4 molekul vody nežli jen čtyř. Samozřejmě uspořádanost struktury se zachovává jen na krátkou vzdálenost [5].

Modely struktury vody v kapalné fázi se dělí do dvou skupin – *modely kontinua* a *směsné modely*. Přičemž směsné modely předpokládají směs molekul vody tvořící jedno-, dvou-, tří-, čtyřvodíkové a tzv. monomery, které netvoří žádné vodíkové vazby. Naproti tomu, modely kontinua tvrdí, že žádné takto striktní skupiny neexistují. Domnívají se, že struktura vodíkových vazeb je u kapalné vody značně deformována. Více upřednostněná teorie z hlediska pravděpodobnosti bývá směsný model, který se dále dělí na *intersticiální model* a *model klastru*. Intersticiální teorie popisuje strukturu vody v kapalné fázi uzavřením monomerních molekul vody do tzv. "klecí" podobným klatrátům prostřednictvím čtyřvodíkových vazeb. Druhá teorie, již zmíněná výše, se liší v prostorovém uspořádání klastrů. Tato teorie předpokládá, že klastry molekul vody spojen čtyřvodíkovými vazbami, jsou nahodile uspořádány mezi jednotlivými molekulami vody. V důsledku lokálních termálních či energetických fluktuací tvoří dvě molekuly vody vodíkové vazby, díky čemuž se stal jejich stav energeticky přijatelnější pro tvorbu třetí a čtvrté vodíkové vazby. Z opačného hlediska, když se přeruší jedna H-vazba v důsledku lokálních fluktuací, další přerušení H-vazeb se stává energeticky výhodnější. Jediné co nebylo zahrnuto v teorii klastru, se týká homogenní nukleace podchlazené vody. Díky již zmíněným fluktuacím energie, podchlazená voda spontánně mrzne, jakmile se ve vodě vytvoří tzv. "embryo" ledu. Tvorba embryí, konkrétně jejich počet klesá v závislosti na teplotě. Hodnota teploty, při které vzniká s velkou pravděpodobností embryo, se udává  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  [2,5].

Jak je všeobecně známé, molekuly vody se chovají jinak v roztoku s různými ionty nežli pouze v čisté kapalné fázi vody. Orientace interakcí voda-voda je velmi odlišná od uspořádání molekul vody kolem iontů, kde se molekuly vody orientují v jednom směru. Jestliže se jedná o kation, molekuly vody jsou otočeny atomem kyslíku ke kationtu. Opačná situace nastává u aniontu, kde se molekuly vody orientují vodíky. Díky přitažlivým silám mezi ionty a molekulami vody dochází k imobilizaci molekul vody, z tohoto důvodu dochází k výraznému poklesu dielektrické konstanty. Tyto přitažlivé síly se ovšem týkají pouze krátkých vzdáleností, konkrétně se tvoří jedna vrstva molekul vody. U malých iontů, jako například iontů fluoridu a lithia, existují dvě až tři vrstvy. Za vrstvami molekul vody uspořádané ve stejném směru se nachází tzv. střední pásmo, kde se struktura jednotně orientovaných molekul vody rozpadá. Avšak strukturovaná voda nezávisí jen na vzdálenosti molekul vody od určitého iontu, velkou roli hraje také koncentrace iontů v roztoku. Je-li koncentrace iontů vyšší ( $\sim 1\text{M}$ ), ovlivňuje druhou a třetí vrstvu orientovaných molekul vody také sousední ion. Koncentrace tudíž určuje, jestli bude převládat tvorba strukturované vody nebo rušení struktury molekul vody v okolí iontů [2,4].

### 2.1.3 Struktura ledu

Struktura ledu se skládá z centrální molekuly vody, která je prostřednictvím H-vazeb obklopena čtyřmi molekulami vody umístěnými v pomyslných vrcholech tetraedru. Vzdálenost atomů kyslíku činí 2,76 Å, jak je vidět na Obrázku 3. Struktura, která již byla popsána, se poté neustále opakuje [2,12].



*Obrázek 3 Struktura krystalu ledu [12].*

Tato struktura je také příčinou nízké hustoty vody v pevném stavu, oproti jiným pevným látkám. A jak už bylo zmíněno výše, rozsáhlost vodíkových vazeb ovlivňuje rovněž vysoké teploty tání a vypařování. Množství energie pro úplné porušení dvou H-vazeb molekuly vody se udává 12,2 kcal/mol [2,4]. Ovšem není pouze jeden typ ledu. Je známo alespoň 16 krystalických typů ledu. V jejich struktuře mají atomy kyslíku stabilně své místo a atomy vodíku jsou či nejsou uspořádány. Například typy II–VII se řadí mezi krystalické ledy, modifikovány za pomoci vysokého tlaku. Zatímco typ VIII vzniká z typu VII při nízké teplotě. Dále existují tři amorfní typy ledu neboli nekystalické fáze [3].

### 2.1.4 Vliv vody na konformace makromolekul

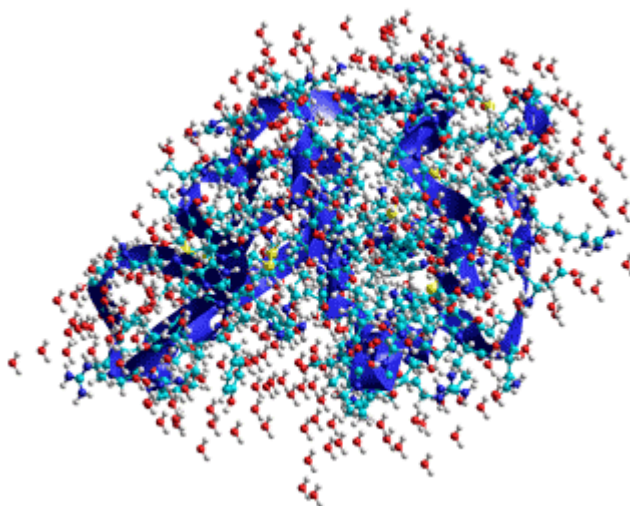
Biologická funkce makromolekul je přímo závislá na jejich konformaci, přičemž makromolekula dává přednost té konformaci, při které má nejnižší energii. Proto i zde voda hraje klíčovou roli, konkrétně prostřednictvím tvorby H-vazeb a podporou agregace hydrofobních molekul prostřednictvím hydrofobního efektu. H-vazby se netvoří pouze mezi molekulami vody, existují také mezi funkčními skupinami makromolekul (báze DNA, peptidové vazby). Všeobecně se předpokládá, že makromolekula zaujme takovou konformaci, která zprostředkovává co nejvíce vnitřních H-vazeb a zároveň maximálně zvýší ostatní síly, které se také podílejí na konformaci. Avšak H-vazby sami o sobě nezajišťují stabilitu, jelikož nejsou dostatečně silné. Naopak jsou tyto H-vazby slabší nežli H-vazby mezi molekulami vody a funkčními skupinami [13]. Tudíž nejvíce stabilní konformace bude ta s největším počtem vnitřních H-vazeb mezi funkčními skupinami makromolekuly, mezi povrchem makromolekuly a molekulami vody a s maximalizovanými dalšími stabilizujícími silami (především hydrofobním efektem) [2].

Jak už bylo zmíněno výše, H-vazba není jediná stabilizující síla. Hydrofobní interakce taktéž stabilizují uspořádání makromolekul a mají rovněž velký vliv na rozpustnost nepochárných látek v polárním rozpouštědle, například benzenu ve vodě. Molekuly vody se uspořádají kolem nepochární molekuly či jen nepochární části a vytvoří strukturu podobnou klatrátu. Vliv hydrofobního efektu lze snadno zjistit ze změny volné energie při zvyšování teploty za použití známé Rovnice 1 (platí pro izotermické děje)

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (1)$$

kde se volná Gibbsova energie ( $G$ ) rovná entalpii ( $H$ ) s odečtením součinu absolutní teploty ( $T$ ) a entropie ( $S$ ) [2,14]. Bylo již prokázáno, že při rozpouštění benzenu ve vodě dochází ke kladné změně volné Gibbsové energie a hodnota entalpie nabývá záporných hodnot. Aby Gibbsova energie nabývala kladných hodnot a entalpie byla zároveň záporná, musí entropie být též záporná. Z čehož vyplývá, že se systém stává více uspořádaný a tudíž se i předpokládá větší výskyt H-vazeb. Avšak tato domněnka byla vyvrácena pomocí infračervené spektroskopie, kde se vibrační stavy H-vazeb mezi molekulami vody a nepochárními látkami zobrazily jako velmi slabé. Tato metoda byla rovněž aplikována na proteiny, kdy nepochární části jako methylová skupina u alaninu či isopropyllová skupina u valinu jsou v průběhu skládání orientovány dovnitř struktury proteinu za účelem omezení kontaktu nepochárných částí s rozpouštědlem (voda). Protein se tak dostává díky konformaci do energeticky výhodnějšího stavu (volná Gibbsova energie se uvolňuje). V důsledku této konformační změny, se stane okolí proteinu více neuspořádané, nežli tomu bylo u předcházející konformace, kde docházelo k hydrofobním interakcím. Podstatou zvýšení neuspořádanosti okolí proteinu je uvolnění molekul vody, které jsou v blízkosti hydrofobního povrchu poutány v uspořádaných, entropicky nevýhodných, klatrátových strukturách [2,14].

Hydratace biopolymerních molekul má také zásadní vliv na jejich velikost. Velikost molekul lze určit prostřednictvím různých technik, například pomocí studia pohyblivosti molekul v elektrickém poli (elektroforéza), určením difúzního koeficientu nebo rentgenovou difrakcí [15,16]. Rozdíl naměřených velikostí stejných molekul těmito technikami je právě důsledkem hydratace, kdy molekuly vody interagují s molekulami měřeného vzorku. Schopnost vody hydratovat biologicky důležité molekuly (viz Obrázek 4), se dále využívá při zkoumání vlastností vody dalšími metodami, kupříkladu stanovení adsorpčních isoterm, dielektrických konstant a využití nukleární magnetické resonance (NMR) a kalorimetrie [2].



*Obrázek 4 Hydratace proteinu [3].*

### **2.1.5 Voda v buňkách**

Buňky obsahují 60-80% vody. Jelikož buňka obsahuje mnoho různých komponent (proteiny, nukleové kyseliny, lipidy aj.), je logické, že se v buňce bude také vyskytovat hydratovaná voda neboli molekuly vody vázané na tyto buněčné komponenty. Pomocí techniky diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), bylo zjištěno, že v určitém bodě – 0,2-0,25 g vody na gram sušiny – se žádné teplo neuvolňuje během chlazení, či neabsorbuje během zahřívání. Toto množství vody se tudíž klasifikuje jako voda neschopná přejít do pevné fáze [17]. Následující experimenty zahrnovaly stanovení adsorpční isothermy, dielektrické konstanty a využití NMR. Konkrétně u metody NMR, měření prokázalo zmenšení intenzity signálu vody, který byl lineárně úměrný obsahu vody v buňce, dokud obsah vody nebyl zredukován do celkových 8 %. Od této hranice snížení obsahu vody v buňce až se obsah vody blížil nule, zůstává intenzita signálu neměnná [2].

Jak už bylo řečeno výše, zbývajících cca 10 % vody v buňce nemůže být odstraněno pomocí mrznutí. Hydrataci vázanou vodu lze ale odstranit prostřednictvím lyofilizace, která se skládá ze tří kroků. Nejprve dochází k zamrznutí 90 % obsahu vody v buňce, která se poté sublimací odstraní pryč. Třetí a poslední krok se skládá z pomalé sublimace hydratované vody do okolí, kde je tlak par udržován prakticky roven nule. Dehydratace v tomto případě probíhá bez jakékoli fázové přeměny. Samozřejmě takto velký zásah v případě dehydratace buňky vyvolá poškození vnitřní struktury i funkce jednotlivých komponent buňky. K charakterizaci tohoto poškození byl např. pozorován únik elektrolytů z buňky do extracelulárního prostředí za použití DSC, kde byla zjištěna hranice 0,4-0,3 g vody na gram sušiny, do které se buňka ještě nepoškozuje [17]. Dehydratace taktéž ovlivňuje konformaci jednotlivých makromolekul. Rovněž v případě enzymatických reakcí hraje hydratovaná voda významnou roli, neboť enzym a substrát musí přejít do bezprostřední blízkosti, avšak budou-li mít na povrchu jednu nebo více vrstev hydratované vody, musí být tato voda před vlastním kontaktem odstraněna. Podobně se tento efekt projevuje např. při buněčných fúzích, kde dochází ke spojení membrán [2].



## 2.2 Kryobiologie

Jeden z nejrozšířenějších stresových faktorů, který je přímo spojen se strukturou a fázovým stavem vody v buňkách, představuje vliv teplot pod bodem mrazu. Proto je proces mrznutí buněk jako modelový stresový faktor podrobně popsán v následující kapitole.

Kryobiologie je odvětví biologie, které se zabývá účinky nízkých teplot na živé organismy, resp. reakcemi živých buněk na přeměnu kapalné vody na led v důsledku nízkých okolních teplot. Zmrazení bývá u většiny biologických systémů letální, avšak může sloužit také například k prodloužení doby uchovávání celých životaschopných orgánů. Nízké teploty obecně zapříčiní zpomalení či úplně zastavení některých biochemických reakcí, ale zároveň mohou paradoxně urychlit jiné biochemické procesy, jelikož ztráta vody a tvorba krystalů ledu zvýší koncentraci rozpuštěných látek podílejících se na biochemických reakcích (např. katalyzovaná oxidace lipidů mikrosomální frakcí z rybí svaloviny v přítomnosti NaCl) [18]. Různých mrazících technik tak může být využíváno jak pro uchování struktury buněk, tak také naopak pro narušení celistvosti buněk [19].

### 2.2.1 Přeměna vody na led

Během přeměny kapalné fáze vody na pevnou fázi, se led (pevná fáze) stává stabilní, jakmile klesající teplota dosáhne teploty, kdy přidaný krystal ledu do kapalné fáze neroztává. Když teplota klesne níže, krystal ledu roste a molekuly vody ztrácejí vlastnosti kapalné fáze. Pokud není do kapalné fáze přidán krystal ledu, nemusí nutně vzniknout krystal ledu i když se teplota bude vyskytovat pod teplotou přechodu. Tento jev vzniká v určitém rozsahu teplot, kde se voda stává metastabilní (podchlazená voda). Ovšem tento stav může být opět narušen přidáním krystalizačním zárodkem, čímž je iniciován fázový přechod. Podchlazená voda je také charakteristická svými jedinečnými vlastnostmi, jako je například větší stlačitelnost nebo větší hustota. Všechny unikátní vlastnosti podchlazené vody vycházejí především z její struktury, která je tvořena klastry molekul vody, tvořící dohromady síť v délce několika molekul. S rostoucí rozlohou sítě, přibývá také větší počet možností k růstu, ale zároveň i počet kolísí, které ji rozrušují. Tento fenomén je přímo závislý na teplotě, konkrétně na teplotě odpovídající kritickému bodu. Je-li teplota vyšší nežli hodnota kritického bodu, zůstává kapalná fáze v podobě sítě tvořené klastry, ale pokud je teploty nižší, kolize jsou překonány začínající nukleací, kde je rostoucí síť přeměněna na krystal ledu [20,21].

Nukleaci lze rozdělit do dvou kategorií a to na homogenní a heterogenní nukleaci. Přičemž v homogenní nukleaci vzniká led z molekul vody a dohromady tak tvoří klastry molekul vody pevné fáze, které samovolně dále rostou. Oproti tomu heterogenní nukleace probíhá za přítomnosti cizích částic, které v kontaktu s vodou iniciují vznik pevné fáze. Výhodou heterogenních nukleací je především schopnost vytvořit tzv. kritický klastr (největší existující klastr před krystalizací) za pomoci vlastností cizích částic či povrchů, které orientují molekuly vody do pomyslných mřížek ledu za vyšších teplot na rozdíl od homogenní nukleace [22]. V případě heterogenních nukleací konkrétně tvorby intracelulárního ledu v buňkách nastává při teplotách  $-5^{\circ}\text{C}$  až  $-15^{\circ}\text{C}$  v isotonickém prostředí za přítomnosti extracelulárního ledu. Nicméně rozsah teplot je pod vlivem mnoha faktorů (chemický, iontové, rychlost zmrznutí aj.) a může se měnit. Například ve vnitřním prostředí liposomů, které neobsahují žádné

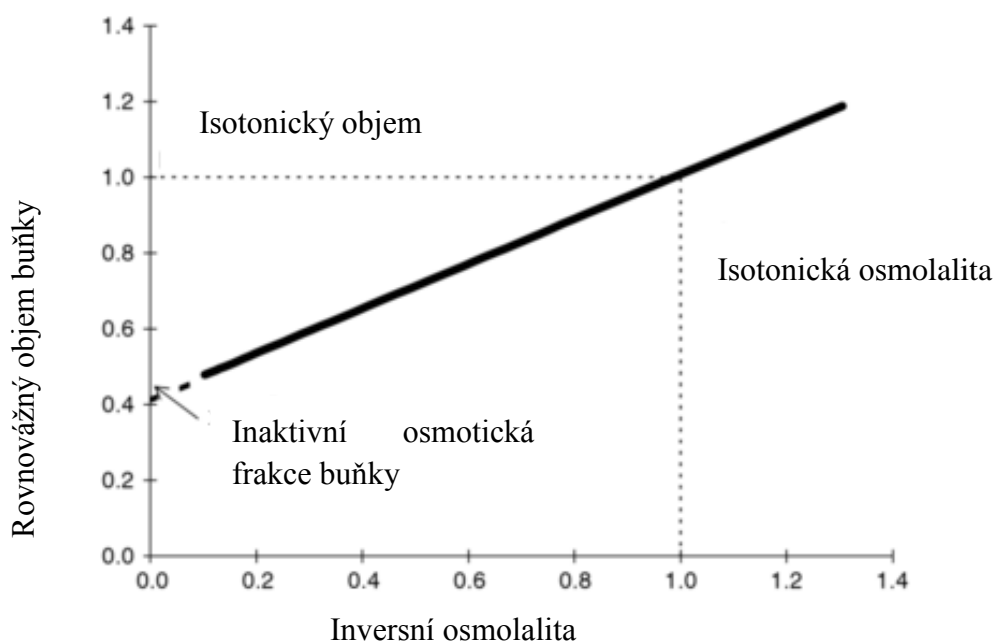
intracelulární komponenty, se rozsah teplot pohybuje od  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Z čehož vyplývá katalytický vliv nejen extracelulárního ledu ale i plasmatické membrány. Zásadní vlivy nukleací jako přítomnost kryoprotektivních látek či rychlost zmrazení budou popsány v samostatných kapitolách (viz. podkapitoly 2.2.4 a 2.2.5) [22,23].

### 2.2.2 Osmotické důsledky mražení buněk

Je-li teplota pod nulou, tvoří se primárně krystaly vody v extracelulárním prostředí buňky. V důsledku částečného zmrazení extracelulárního roztoku klesá jeho chemický potenciál (funkce tlaku, teploty a tlaku), díky čemuž je voda transportována skrz polopropustné buněčné membrány ve snaze ustavení nové rovnováhy mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím [22]. Dochází tak k dehydrataci, v jejímž důsledku buňka nabývá jiný objem, který lze vypočítat za použití Boyle-van't Hoffovi rovnice (viz Rovnice 2).

$$V = \pi_e^0(V_o - b) \frac{1}{\pi_e} + b, \quad (2)$$

kde  $\pi_e$  je osmolalita extracelulárního roztoku,  $b$  je osmoticky neaktivní objem buňky,  $\pi_e^0$  je extracelulární osmolalita a  $V_o$  je objem buňky za isotonických podmínek. Avšak tato rovnice platí pouze pro ideálně zředěné roztoky, navíc nelze osmolalitu v rovnici nahradit osmotickým tlakem, jestliže je tento vztah využíván za různých teplot [20]. Grafické zobrazení Boyle-van't Hoffovi závislosti ilustruje Obrázek 5, kde je poměrný objem buněk funkcí inverzní osmolality. Takto linearizovaná závislost je využívána pro odhad objemu osmoticky neaktivní frakce z celkového objemu buňky, jestliže je roztok ideálně zředěný. V opačných případech je tato hodnota mírně zavádějící. Je-li buňka vystavena zvýšené koncentraci v extracelulárním prostředí, buňka se smrští v důsledku vyrovnání chemických potenciálů na definovaný objem [19].

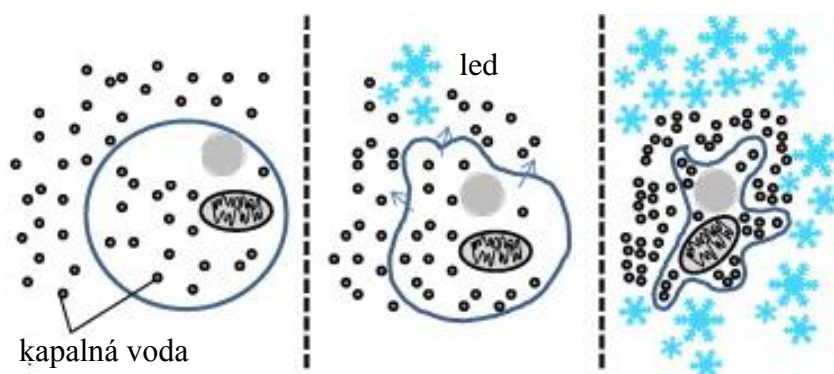


**Obrázek 5** Zobrazení Boyle-van't Hoffovi rovnice [24].

Dalším důležitým faktorem osmózy je rychlost vyrovnání chemických potenciálů, konkrétně rychlost transportu vody z intracelulárního do extracelulárního prostředí (tj. rychlost dehydratace buňky), která je přímo úměrná jak velikosti gradientu, tak propustnosti plasmatické membrány (závislost na počtu bílkovinných kanálků, které transportují vodu, tzv. aquaporinů) [24].

### 2.2.3 Vliv nízkých teplot na intracelulární a extracelulární vodu

Jak už bylo zmíněno výše, vytvoří-li se krystalky ledu v extracelulárním prostředí buňky, samotná buňka se díky rozdílu chemických potenciálů intracelulárního a extracelulárního prostředí dehydratuje, dokud nedojde k opětovnému ustavení rovnováhy. Voda v intracelulárním prostředí přitom svoji fázi nemění, neboť hodnota bodu mrznutí se snižuje v důsledku zvyšování koncentrace rozpuštěných látek v intracelulárním prostředí. Rozdíl chemických potenciálů prostředí je především způsoben vyšším chemickým potenciálem podchlazené vody (intracelulární kapalná fáze). Následná dehydratace se poté projevuje zmenšením objemu buňky, tzn. smrštěním. S klesající teplotou dochází ve větší míře k dehydrataci pro udržení rovnováhy. Důsledkem intenzivnější dehydratace je tak logicky i větší smrštění buňky (viz Obrázek 6) [25].



**Obrázek 6** Vliv extracelulárního ledu na objem buňky a chemický potenciál [25].

Avšak celá tato kaskáda dějů je přímo závislá na teplotě a na přítomnosti či nepřítomnosti extracelulárního ledu. Jestliže se extracelulární led nevyskytuje, zůstává podchlazená voda uvnitř buňky stabilní při teplotním rozsahu  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Naproti tomu, výskyt extracelulárního ledu při těchto teplotách podmiňuje tvorbu intracelulárních krystalků ledu. Teplota může být taktéž ovlivněna kvalitou buněčné membrány a přítomností kryoprotektivních látek [22,24].

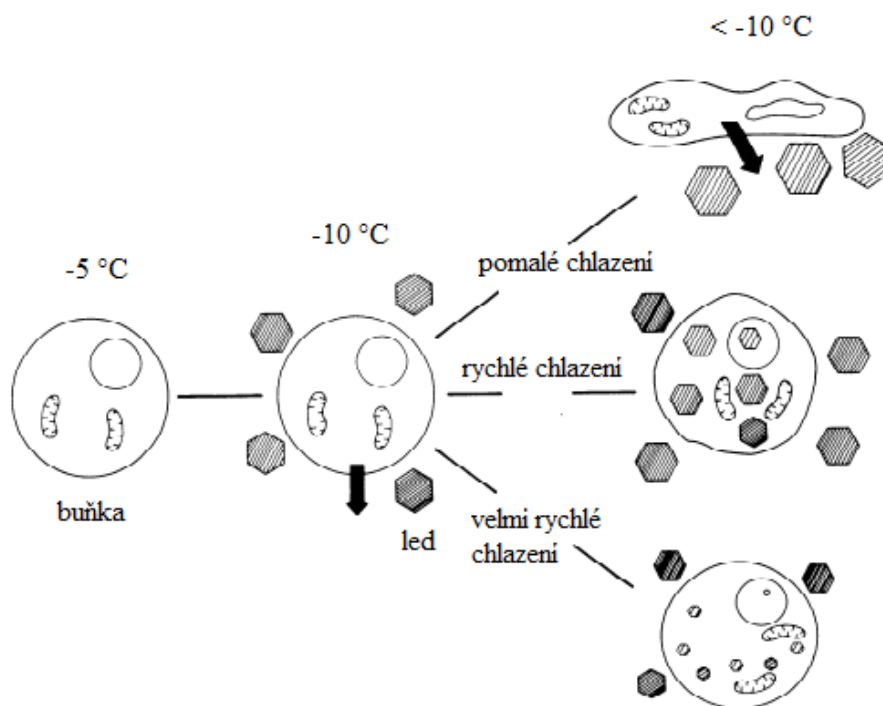
### 2.2.4 Principy růstu intracelulárních krystalizačních zárodků

Začátek nukleace a následný růst nukleačních krystalků ledu podléhají několika experimentálně podloženým mechanismům. Jeden z nich dokládá nutnost těsného kontaktu extracelulárního ledu pro již zmíněnou tvorbu intracelulárního ledu okolo teploty  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , zatímco za nižších teplot intracelulární nukleace probíhá i při naprosté absenci extracelulárního ledu. Další mechanismus týkající se vzniku intracelulární nukleace probíhá při  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kdy je jak prostor v buňce tak i vně podchlazen. Jestliže je momentální teplota nižší nežli teplota odpovídající nukleační teplotě buňky, nastává intracelulární nukleace pomocí vlivu extracelulárního ledu. Zatímco v opačném případě, konkrétně za vyšší teploty nežli

je nukleační teplota buňky, žádná intracelulární nukleace neprobíhá ani za přítomnosti extracelulárního ledu. Tento stav přetrvává i za podchlazení vody buňky. Přičemž nukleační teplota klesá v závislosti na zvyšující se koncentraci rozpuštěných látek v extracelulárním prostoru [2, 26]

### 2.2.5 Vliv rychlosti chlazení

Klíčovou úlohu při fázových přechodech buněčné vody hraje dále rychlost chlazení buňky (viz Obr. 7). Jak je zobrazeno na Obr. 7, při teplotě  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  zůstává buňka i její okolí v kapalném stavu v důsledku podchlazení vody. Snížili se teplota na  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vytváří se led pouze v okolí buňky, kdy tvorba ledu ve vnějším prostředí je způsobena podchlazením intracelulární vody (vyšší chemický potenciál), které je odděleno od extracelulárního prostředí pomocí cytoplazmatické membrány. Mezi velmi důležité faktory ovlivňující fyzikální změny v průběhu snižování teploty je zajisté rychlost ochlazení. Jak je patrné na Obr. 7, jestliže je rychlost chlazení dostatečně pomalá, vyrovnává se chemický potenciál podchlazené vody uvnitř buňky a částečně zmrzlé extracelulární vody v prostředí buňky, prostřednictvím tzv. exosmózy, kdy dochází k dehydrataci buňky neboli k výdeji vody do extracelulárního prostředí pro udržení rovnováhy již zmíněných chemických potenciálů. Na rozdíl od pomalé rychlosti chlazení, kdy vzniká pouze extracelulární led, v průběhu rychlého chlazení nedochází k dostatečné dehydrataci. Důsledkem toho, vzniká intracelulární led, který vyrovnává chemické potenciály jak vnitřního tak vnějšího prostředí [24].

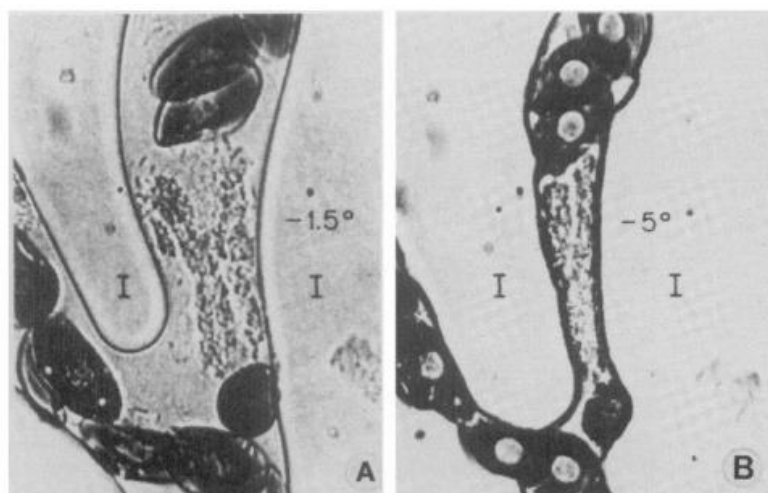


**Obrázek 7** Zamrzání buněk při různých rychlostech chlazení [24].

Chování buněčné vody při různých rychlostech mražení je možné popsat také kvantitativně na základě kombinace vztahů, týkajících se osmotického tlaku, tlaku par aj. Tak lze vypočítat množství podchlazené vody v buňce jako funkci rychlosti ochlazení. Pro umožnění takového kvantitativního popisu je nutno znát permeabilitu buňky vůči vodě, její aktivační energii, počáteční koncentrace rozpuštěné látky v buňce a poměr velikosti povrchu buňky a jejího objemu. Takto vypočítané množství intracelulární vody je poté vyneseno v závislost relativního objemu vody buňky na teplotu odpovídající isotonickému objemu vody buňky. Použitím těchto vypočítaných dat je dále umožněno určit i pravděpodobnost zamrzání intracelulární vody jako funkci rychlosti ochlazení. Jestliže jsou buňky dostatečně dehydratovány a tudíž obsahují množství intracelulární vody udržující rovnováhu chemických potenciálů, pravděpodobnost tvorby intracelulárního ledu se rovná nule, přičemž buňky, které jsou neustále podchlazovány až do dosažení jejich nukleační teploty, je vysoká pravděpodobnost vzniku intracelulárního ledu, důsledkem nedostačující dehydratace. Samozřejmě hodnoty rychlostí ochlazení, při kterých vzniká intracelulární led, se mění s ohledem na koeficientu permeability vody pro danou teplotu, aktivační energii a na poměr velikosti povrchu na objemu pro různé typy buněk. Například se s rostoucím průměrem buňky, naopak klesá rychlost ochlazení pro zachování pravděpodobnosti vzniku intracelulárního ledu, neboť ztráta vody během ochlazení je úměrná poměru povrchu buňky k jejímu objemu [2,24,27].

Experimentálně byl prokázán trend mezi rychlostí chlazení a citlivostí buňky na rychlost zpětného ohřívání. Konkrétně buňky podrobené velmi rychlému ochlazení (*vitrifikaci*), kdy dochází k intracelulárnímu zmrznutí buňky, bývají podstatně citlivější k pomalejšímu zahřívání nežli k rychlému. Naopak u nízké rychlosti ochlazení bez tvorby intracelulárního ledu, nebyla zaznamenána žádná podobná citlivost [24,28]. Jak už bylo zmíněno výše, vysoká rychlost ochlazení je příčinou zvýšení množství podchlazené vody až tvorby intracelulárního ledu, přičemž krystalky ledu při extrémních rychlostech dosahují tak malých rozměrů, díky kterým jsou krystalky ledu patrné pouze pomocí elektronové mikroskopie, (viz následující podkapitola) [24,29].

Na rozdíl od vysokých rychlostí, během nízké rychlosti chlazení nevznikají žádné intracelulární krystalky ledu, protože je dostatek času na transport potřebného množství vody zevnitř buňky ven a chemické potenciály intracelulární a extracelulární vody zůstávají v rovnováze [24]. V těchto případech je poškození buňky zapříčiněno buď toxickými efekty způsobenými zvýšenou koncentrací elektrolytů v intracelulárním prostředí anebo přílišným smrštěním buňky vlivem osmotického stresu [20]. Většina hypotéz zabývajících se defekty buňky v důsledku pomalého ochlazení se shodují na tom, že poranění buňky je důsledkem snížení chemického potenciálu vody. Jinými slovy, zbylé množství vody v kapalně fázi má velký vliv na poškození buňky. Z tohoto důvodu je poškození buňky chlazením kromě počátečního objemu buňky výrazně ovlivněno také počátečním složením extracelulárního roztoku, který má vliv na zbývajících kapalnou fázi během pomalého ochlazení. Během pomalého ochlazení jsou buňky uskupeny v úzkých kanálcích nezmrzlého roztoku mezi již vytvořeným extracelulárním ledem (viz Obrázek 8). Úzké kanálky se dále zužují s klesající teplotou, přičemž dochází k čím dál většímu smrštění buněk [2,20,24].



**Obrázek 8** Erytrocyty žáby během pomalého ochlazování [24].

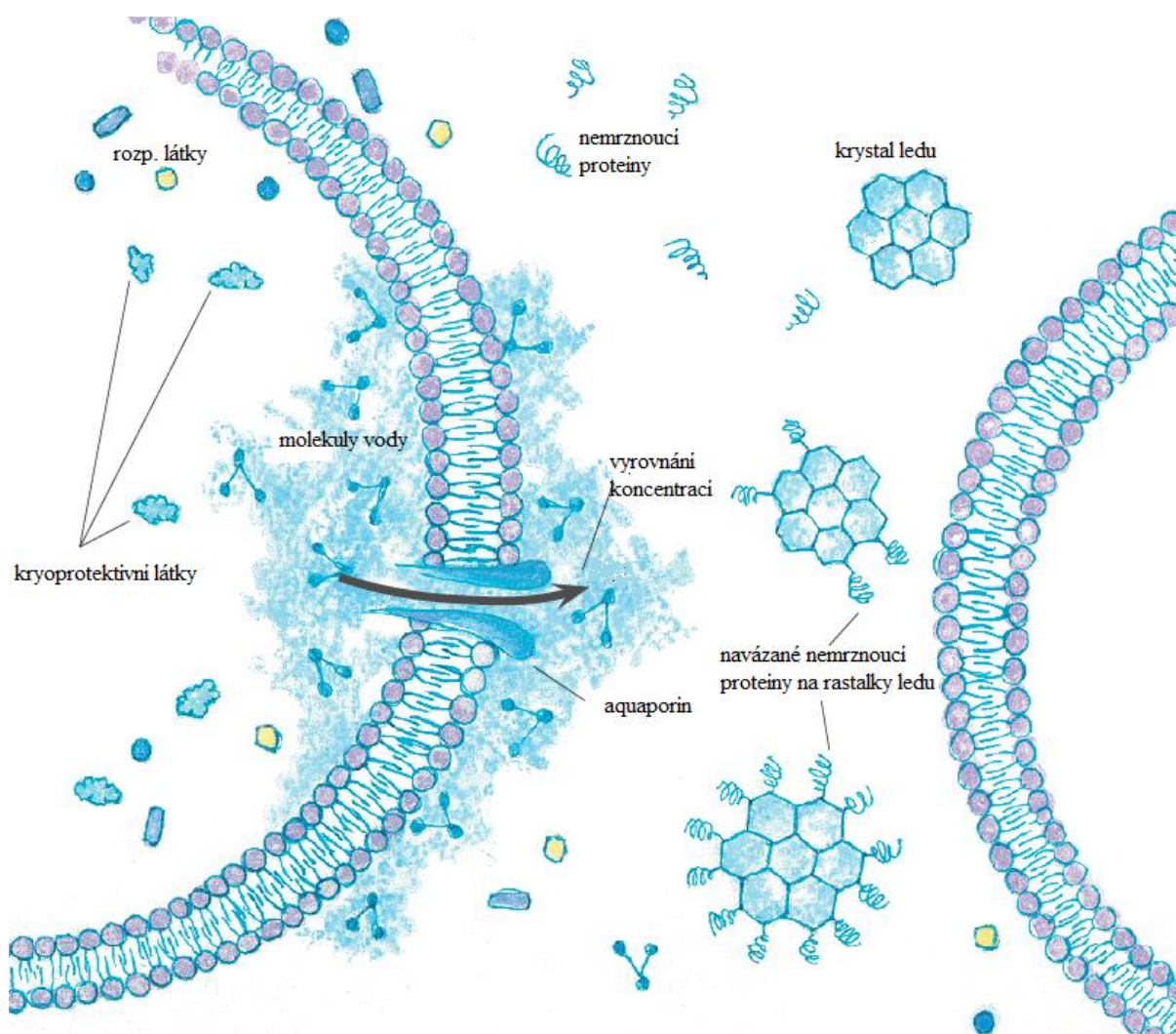
Nedávné experimenty naznačily vedle osmotických efektů taktéž vliv dalších fyzikálních sil na změnu objemu a poškození buňky v průběhu chlazení. Důležitou roli hraje pravděpodobně rozpínající se objem ledu, který může ovlivnit jak objem, tak i tvar buňky [24]. Rozsah optimálních rychlostí chlazení pro různé buňky spočívá ve schopnosti dehydratace jednotlivých buněk. Optimální rychlost chlazení, způsobující minimální poškození buňky, lze definovat jako rychlost, kdy se s libovolným zvýšením této rychlosti zvýší pravděpodobnost tvorby intracelulárního ledu. Při optimální rychlosti rovněž platí, že se s narůstající rychlostí ochlazení zkrátí doba vzniku extracelulárního ledu a tím dojde i k redukci škodlivým účinků vůči buňkám. Přičemž poškození buněk prostřednictvím vlivu jak intracelulárního či extracelulárního ledu spočívá v destabilizaci membrán, která může dospět až k mechanickému poškození [24,30].

### 2.2.6 Kryoprotektivní aditiva

Aplikace kryoprotektivních látek má velký význam například v oblastech molekulární biologie či moderní medicíny při kryokonzervaci živých buněk či dokonce celých tkání. Mezi kryoprotektivní látky (*cryoprotective agents*, CPA) se řadí ty látky, jejímž vlivem je množství živých buněk po rozmrazení vyšší nežli za jejich nepřítomnosti (v kontrolním vzorku) [31]. [31]Mezi CPA patří celá škála organických molekul, od nízkomolekulárních až po vysokomolekulární aditiva. CPA se běžně klasifikují dle penetrační doby, což je čas, během něhož dojde k penetraci látky, kdy vstupuje část CPA do buněk a molekuly vody jsou tak vytlačovány do extracelulárního prostředí buňky. CPA se dle penetrační doby dělí na látky, které pronikají v rámci 30 minut (metanol, etanol, etylenglykol aj.), látky které se absorbují později (glycerol, mono-, oligo- a polysacharidy aj.) a na látky které nepronikají vůbec (polyvinyl alkohol, polyetylenenglykol (PEG) aj.), neboť jsou využívány pro extracelulární prostředí v 10-40% koncentracích, kdy jsou molekuly vody dostávány z buněk osmotickou cestou. Ačkoli propustnost některých látek může být ovlivněna především teplotou a typem buňky (např. glycerol), jelikož některé CPA proniknou pouze buněčnou stěnou nikoli plazmatickou membránou (aminokyseliny, mono a disacharidy). CPA pronikající jak buněčnou stěnou, tak i plazmatickou membránou jsou konkrétně glycerol a dimetylsulfoxid ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ) [32].



CPA se vyskytují v přírodě zcela přirozeně v různých podobách, jako tzv. nemrznoucí proteiny (hmyz, bakterie, rostliny) či kompatibilní rozpuštěné látky, které jsou metabolizovány a akumulovány za stresových podmínek pro určitý biologický systém (extrémní studené prostředí, dehydratace okolního prostředí za nízkých teplot). Úkolem těchto CPA je především ochránit biologický systém před ztrátou vody na buněčné úrovni, ať už v důsledku tvorby ledu či odpaření při vysoušení buněk. Obrázek 9 ilustruje způsob, jakým se nemrznoucí protein prostřednictvím H-vazeb naváže na krystalky ledu, čímž předchází tvorbě větších krystalů ledu. Dále je tu znázorněn kryoprotektivní mechanismus týkající se vyrovnání koncentrací intracelulárního a extracelulárního prostoru využívající membránového proteinu aquaporin, který přímo reguluje tok vody ven a dovnitř buňky [31].



**Obrázek 9** Kryoprotekční mechanismy [33].

Mezi další CPA, konkrétně rozpuštěné látky mající kryoprotektivní účinky patří již zmíněný glycerol a cukry [31]. Typickým příkladem cukru akumulujícího se v buňce za extrémních podmínek je mimo jiné trehalóza. Tento disacharid interagující s plazmatickou membránou napomáhá skelnému přechodu vzorku a zároveň se vyznačuje nízkou toxicitou. Proto je trehalóza velmi účinná a využívá se v celé řadě biologických systémů v rámci kryokonzervace [34].

Díky přítomnosti CPA (H-vazby mezi CPA a proteiny přispívající hydrataci), se buňky stávají méně citlivé k pomalému chlazení, během kterého dochází především k úbytku kapalné fáze v okolí buňky a ke zvýšení koncentrace iontů. Přidáním nepenetrujících CPA se celkově zvýší objem extracelulární kapalné fáze a sníží se tak i následná koncentrace iontů [24]. Samozřejmě by buňka měla přežít bez jakýkoli poškození přidané množství jednoho či více CPA. Například při použití glycerolu se udává koncentrace 1-5 mol/l, která je dostačující ke kompenzaci negativního vlivu solí, kdy celý systém dosáhne skelného stavu a i za nižší teploty je nadále ochráněn před růstem ledových krystalů v důsledku vysoké viskozity [31]. Obecně lze účinnost CPA stanovit dle toxicity a rozpustnosti za určitých teplot a koncentrací. Ačkoli jsou některé CPA za běžných podmínek toxicky nezávadné, důsledkem vyšších koncentrací a vyšších teplot se mohou projevit částečně toxické účinky vůči biologickým systémům. Takto vzniklá toxicita lze předejít či omezit dvěma způsoby, zaprvé budou použity kryoprotektanty s menší penetrační schopností a za druhé, zkrátí se časový interval působení CPA. Avšak tyto kroky jsou použitelné pouze na malé vzorky nežli pro tkáň či celé orgány [35,36]. Kritická situace může nastat i během zpětného ohřevu buněk, kdy CPA neprostupuje membránou tak rychle jako voda vyrovnávající chemický potenciál extracelulárního a intracelulárního prostoru. Buňky poté praskají z důvodu nadměrné absorpce vody do intracelulárního prostoru jako důsledek nevhodné aplikace CPA (výběr, podmínky) [31].

### **2.2.7 Vliv rychlosti zpětného zahřívání buněk**

Buňky, uchovávané metodou kryoprezervace, musejí přežít nejen vlastní ochlazení, ale také zpětné ohřívání při jejich dalším použití. Buňky tak prochází nejkritičtější oblastí teplot  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  hned dvakrát [20]. Jak už bylo zmíněno v předcházejících podkapitolách, vliv rychlosti zahřívání na přežití buňky respektive na její poškození se odvíjí od její předešlé rychlosti ochlazení [2]. Pokud byla buňka zmrazena vysokou rychlostí, je pro ni příznivější rychlé zpětné zahřívání za účelem omezení rizika rekrystalizace. To je způsobeno faktem, že při rychlém chlazení dochází k tvorbě velmi malých intracelulárních krystalků vody, které při velmi vysokých rychlostech bývají dokonce až neviditelné pro ultramikroskopické metody. Pro tento účel je proto využívána technika kryoelektronové mikroskopie. Na rozdíl od velkých krystalů ledu jsou malé krystalky ledu termodynamicky nestabilní, díky čemuž tají za nižších teplot. Důsledkem rozdílných teplot tání, může nastat rekrystalizace, kdy dochází k agregaci malých krystalků ledu a vytváří se tak velké krystaly ledu, které poškozují buňku mnohem více [20,37].

Z hlediska vlivu rychlosti zpětného zahřívání v případě nízké rychlosti předchozího zmrazení buněk mohou nastat hned tři situace. Rychlost zpětného zahřívání buď nemá prakticky žádný vliv, nebo vzniká větší poškození buňky za nízké rychlosti zahřívání než za vysoké a naopak. Všechny tři případy mají své zástupce, přičemž první situace nastává především při použití kryoprotektantů. tomu, letální efekt pomalého ohřívání bývá opět způsoben rekrystalizací intracelulární vody. V posledním případě, tj. za rychlého zahřívání pomalu ochlazených buněk, dochází k osmotickému šoku. Důvodem je zvýšená koncentrace rozpuštěných látek v buňce kvůli vyrovnání koncentrací během pomalého chlazení, přičemž



rychlé zpětné zahřívání neumožní navrácení rozpuštěných látek zpátky do extracelulárního prostoru. Buňka tak navyšuje příjem vody až k samotné lyzi buňky [2].

### 2.3 Modelové mikroorganismy - *Cupriavidus necator*

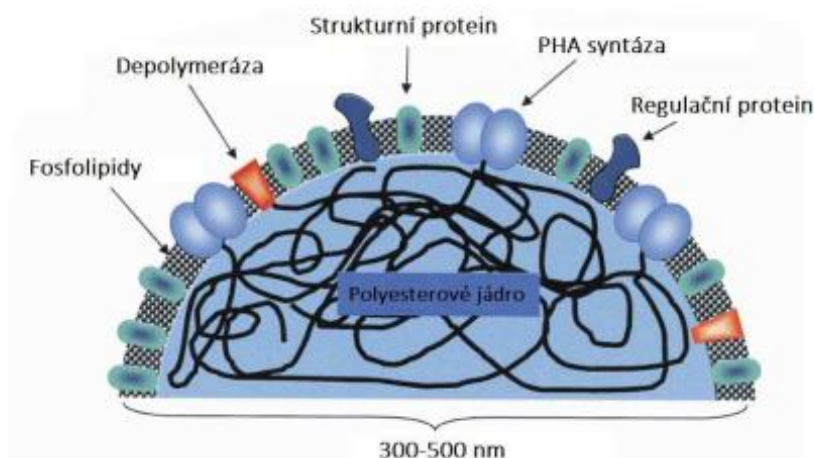
Jako modelové mikroorganismy, podrobené fyzikálně-chemickým analýzám v rámci experimentální části předložené práce, byly především z důvodu dlouhodobého systematického studia na pracovišti Fakulty chemické VUT v Brně zvoleny dva kmeny bakterie *Cupriavidus necator*. Referenční (*wild-type*) kmen (*Cupriavidus necator* H16) a jeho mutantní kmen (*Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup>) slouží jako modelové systémy mikroorganismů produkující polyhydroxyalkanoáty (PHA) za určitých podmínek [38]. Díky častým změnám v taxonomii lze tuto bakterii v literatuře stále často nalézt pod názvem *Ralstonia eutropha* z roku 1995. Nynější název *Cupriavidus necator* H16 získala bakterie v roce 2004, kdy byla opět přejmenována z *Wautersia eutropha* H16 [39].

#### 2.3.1 Výskyt a vlastnosti bakterie

Bakterie *Cupriavidus necator* H16 patří mezi gram-negativní striktně respirační fakultativně chemolitoautotrofní bakterie vyskytující se ve sladké vodě či v půdě, které využívají jak organické sloučeniny tak H<sub>2</sub> jako zdroj energie a uhlíku, přičemž mají schopnost fixace CO<sub>2</sub> ze vzduchu do Calvin-BensonBasshamova cyklu. Naproti tomu, v případě anoxie (nedostatek kyslíku v organismu a okolí) jsou bakterie schopny přejít do denitrifikačního chodu, kde dusičnany slouží jako alternativní akceptor elektronů. Mezi zdroje energie a organického uhlíku patří jak meziprodukty Citrátového cyklu, tak cukerné kyseliny, mastné kyseliny aj. Ohledně sacharidů je využití omezeno pouze na fruktózu a N-acetylglukosamin díky nepřítomnosti enzymu fruktóza-1,6-bisfosfatázy, proto je fruktóza dále metabolizována Entner-Doudoroffovou dráhou. V současné době je též známá kompletní nukleotidová sekvence, přičemž se genom skládá ze tří replikonů – chromozom 1, chromozom 2 a megaplasmidu pHG1 [40,41]. Kde právě megaplasmid pHG1 hraje zásadní roli nositele základní genetické informací fakultativně litoautotrofních a fakultativně anaerobních mikroorganismů. Bylo zjištěno, že více než 30 genů vyskytující se na megaplasmidu pHG1 souvisí s anaerobním metabolismem, konkrétně s denitrifikací. Největší segment megaplasmidu (41 genů) kóduje tvorbu čtyř hydrogenáz související s litoautotrofií. Další rozsáhlý úsek megaplasmidu se týká genů související s katabolismem aromatických sloučenin [42]. Megaplasmid pHG1 obsahuje rovněž dva geny týkající se metabolismu polyhydroxyalkanoátů (PHAs), kde první gen phaP2 kóduje protein kasin nezbytný pro tvorbu povrchu cytoplazmatických granulí PHAs. Druhý gen phaZ kóduje polyhydroxybutyrát depolymerázu, která je nutná pro využití úložiště poly(3-hydroxybutyrátu) (PHB) jakožto nejrozšířenějšího typu PHA [40].

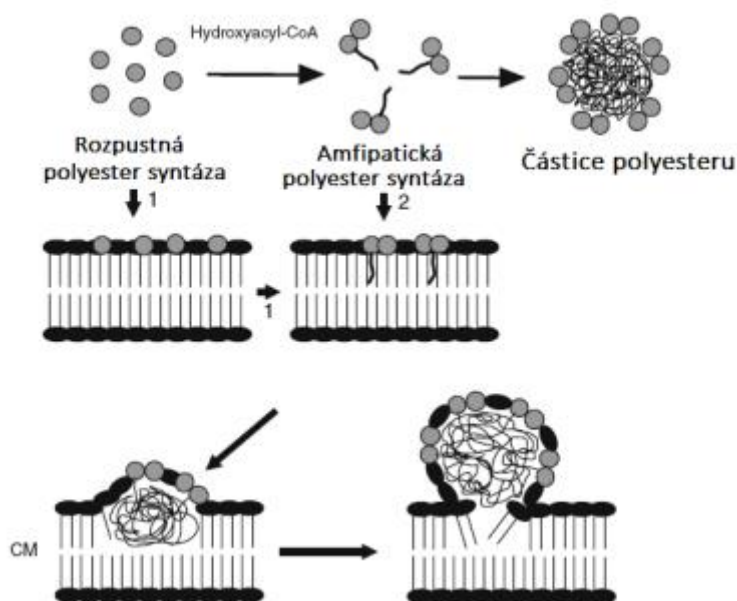
Jedná se tak o nejlépe prozkoumanou bakterii produkující PHB, který je dále akumulován ve velkém množství v cytoplasmě uvnitř bakterie ve formě intracelulárních inkluzí viz Obrázek 10, na rozdíl od mutantního kmenu *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup> neprodukujícího PHB. Ovšem počet a velikost granulí závisí na kultivačních podmínkách a druhu bakteriálního kmenu. Povrch granulí, jak jde vidět na Obr. 10 je tvořen fosfolipidovou dvojvrstvou, která způsobuje

hydrofilní charakter granuly, čímž akumulace PHB nijak nezvýší intracelulární osmotický tlak [40,43].



**Obrázek 10** Struktura polyhydroxyalkanoátové granule [44].

Intracelulární granule PHA mohou vzniknout *in vivo* dvěma způsoby, viz Obrázek 11. Buď pomocí tvorby micel, kde se granule PHA tvoří volně v cytoplasmě, nebo prostřednictvím pučícího procesu, za produkce membránového materiálu v podobě izolovaných granulí. Takto vzniklé PHA granule se také nevyskytují volně v cytoplasmě, jako tomu bylo u micelárního modelu, ale jsou rozmístěny poblíž membrány [43].



**Obrázek 11** Modely tvorby granulí [43].

### 2.3.2 Stresová odpověď bakterií

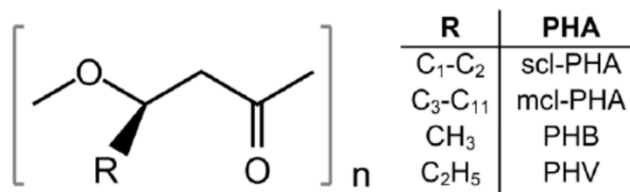
Schopnost bakterie přežít extrémní podmínky, ať už z hlediska dostupnosti živin, teploty, pH, oxidaci či koncentraci přítomných solí, závisí především na rychlosti odezvy regulačních systémů a přizpůsobení metabolických činností mikroorganismů (změny v genové expresi, aktivita proteinů) [45,46]. Bakterie mají tudíž vyvinuté mechanismy umožňující přežít

hladovění a snášet více stresových faktorů. Předpokládá se, že k obranným mechanismům taktéž patří akumulace PHA v inkluzních tělískách jako zásobního materiálu pro přežití za stresových podmínek. Avšak přesný princip mechanismu využití PHA ve stresové odpovědi není stále dostatečně objasněn [47].

Ačkoli by se mohlo zdát, že hromadění polymerů jako je PHA má především význam z hlediska zásobního zdroje, byl rovněž prokázán přímý vliv výskytu PHA v bakteriích na přežívání mikroorganismů za nízkých teplot. Konkrétně byl tento efekt pozorován u mikroorganismů produkujících PHB patřících do rodu *Bacillus* vyskytující se v antarktických vzorcích, kde po zahřátí byl nečekaně izolován kmen *Pseudomonas*. Následně bylo experimentálně potvrzeno, že kultura, která akumulovala PHB měla výrazně vyšší odolnost vůči nízkým teplotám na rozdíl od kultury, která neměla schopnost akumulace PHB [47]. Další studie, zaměřená na bakteriální kmen *Rhizobium* DDSS69, prokázala úbytek PHB důsledkem nízké teploty. Nicméně pokles obsahu intracelulárního PHB za nízkých teplot nesouviselo se stresovou odpovědí, nýbrž s inhibicí biosyntézy PHB a se zvýšeným rozpadem polymeru [48]. Jiné experimenty porovnávající divoký kmen *Aeromonas hydrophila* 4AK4 produkující kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyhexanoátu a neprodukující kmen *Aeromonas hydrophila* CQ4 s narušenou PhAc-syntázou, prokázaly větší odolnost divokého kmenu *Aeromonas hydrophila* 4AK4 vůči teplotnímu šoku, UV záření a osmotickému tlaku. Tento kopolymer se mimo to projevoval vyšší biokompatibilitou a lepšími mechanickými vlastnostmi ve srovnání s PHB [49].

### 2.3.3 Struktura a vlastnosti polyhydroxyalkanoátů

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polyestery hydroxykyselin patřící mezi biologicky degradovatelné polymery s velkým aplikačním potenciálem. Schopnost produkce PHA a její akumulace v cytoplasmě byla již potvrzena u celé řady mikroorganismů. Jak už bylo zmíněno výše, PHA neslouží pouze jako zásobní látka představující zdroj energie a uhlíku, ale díky své nízké rozpustnosti a vysoké molekulové hmotnosti má důležitou roli coby kryoprotektivní látka [47,50]. Z hlediska délky monomerních jednotek lze PHA rozdělit do dvou skupin, na skupiny *short-chain-length* (scl-PHA) a *medium-chain-length* (mcl-PHA). Skupina scl-PHA je složena z monomerů o počtu tří až pěti atomů uhlíku, zatímco mcl-PHA obsahuje monomery o velikosti šesti až čtrnácti atomů uhlíku (viz.Obrázek 12) [51].



**Obrázek 12** Struktura možných kombinací polyhydroxyalkanoátů [52].

Bylo objeveno více než 100 různých monomerních jednotek, které slouží jako stavební složky zásobního PHA. Díky této rozmanitosti je umožněno biotechnologicky vyrábět různé typy biologicky odbouratelných polymerů s odlišnými vlastnostmi, přičemž molekulová hmotnost PHA dána výrobcem, se pohybuje v rozmezí 50 000-1 000 000 Da. Dále jsou všechny monomerní jednotky v D(–) konfiguraci vzhledem ke stereospecifitě biosyntetických enzymů

[53]. Z hlediska vlastností, existují polymery jak krystalické tak pružné a elastické. Příkladem vysoce krystalického polymeru s teplotou tání při 180° je polymer P(3HB). Tento materiál je charakteristický svojí křehkostí a tuhostí. Avšak právě kombinací různých monomerních jednotek s P(3HB) je dosaženo výrazné zlepšení mechanických vlastností. Pro tvorbu kopolymerů PHB je využíván například 3-hydroxyvalerát (3HV), 3-hydroxyhexanoát (3HHx) či 4-hydroxybutyrát (4HB). Zatímco P(3HB) je opticky čistý biokompatibilní polymer schopný piezoelektrického jevu napomáhající při osteoindukci, na kopolymer P(3HB-3HV) se vyznačuje nižší teplotou tání a vyšší pružností v důsledku ztráty krystalinity. Nicméně vlastnosti kopolymerů závisí na poměrovém zastoupení jednotlivých polymerů, konkrétně u kopolymeru P(3HB-3HV) obsahujícího více než 20 % mol 3HV monomerních jednotek se jedná o materiál využitelný pro výrobu filmů a vláken s různou elasticitou. Naproti tomu P(4HB) se jako termoplastický materiál vyznačuje výbornou pevností v tahu, podobnou jakou má např. polyetylen. Charakteristické vlastnosti jednotlivých polymerních materiálů jsou shrnuty v Tabulce 1 [51,53].

**Tabulka 1** Fyzikální vlastnosti polymerních materiálů [51].

Vlastnosti	poly(3HB)	poly(3HB-HV)	poly(4HB)
Teplota tání [°C]	177	150	60
Teplota skelného přechodu [°C]	4	-7,25	-50
Pevnost v tahu [MPa]	40	25	104
Prodloužení při přetržení (%)	6	20	100

Obecně lze konstatovat, že PHA jsou biokompatibilní, biodegradovatelné termoplasty, které lze vyrobit biotechnologicky s využitím obnovitelných zdrojů. Díky svým vlastnostem jsou široce aplikovány v různých oblastech průmyslu. Nejprve byly používány jako náhrada polypropylenu či polyethylenu pro výrobu obalů (fólie, plastové lahve aj.), v současné době jsou již využívány i pro výrobu nátěrových hmot. Díky biologickému odbourávání těchto polymerů, jsou také využity v rámci medicínských aplikací, konkrétně jako kardiovaskulární produkty (regenerace tkání tepen a srdečních chlopní), nosiče léků nebo jako proléčiva [51]. Nicméně samotná biodegradace PHA může být ovlivněna dalšími faktory, jako jsou například nízká molekulová hmotnost polymeru, hodnota bodu tání, chemická struktura (funkční skupiny) či úroveň uspořádanosti polymeru (krystalinita) [53,54].

## 2.4 Studium struktury a vlastností poly(3-hydroxybutyrátu) z hlediska kryoprotektivních účinků

Jak již bylo zmíněno výše, PHB může sloužit jako zásobní látka energie a uhlíku tak i jako kryoprotektantní látka. Tyto látky jsou intenzivně zkoumány především díky svému velkému aplikačnímu potenciálu v rámci různorodých oblastech průmyslu [50]. Výzkum těchto látek probíhá soustavně již od doby, kdy byly PHA roku 1926 objeveny francouzským mikrobiologem Lemoignem, který izoloval a charakterizoval PHB z bakterie *Bacillus megasterium*. V současnosti je známá celá řada mikroorganismů, kteří se vyznačují schopností produkce a akumulace PHA (grampozitivní i gramnegativní kmeny) [43]. Experimentální studie PHA, zabývající se celou šíří témat od biodegradace [55,56] přes faktory ovlivňující míru produkce [57,58] až po samotný vliv PHB na přežití buněk (viz dále) využívají celou škálu metod a přístrojové techniky.

*Ayub a spol. (2004)* navrhli přímou souvislost mezi akumulací PHB a zvýšenou odolností vůči nízké teplotě u bakteriálního kmenu *Pseudomonas sp.* izolovaného ze vzorku, který byl odebrán v antarktickém prostředí. U tohoto kmene se projevila schopnost akumulace velkého množství PHB i za extrémních podmínek. Experimenty proběhly jak v podmínkách umožňujících akumulaci PHB tak v neakumulativních podmínkách, přičemž u bakteriální kultury obsahující PHB byla pozorována zvýšená tolerance k teplotnímu stresu. Z experimentálního hlediska byla studie zaměřena na stanovení viability bakteriálních kultur [47].

Mezi experimenty, zabývajícími se studiem fyzikálně-chemickými změnami biologických systémů vlivem nízkých teplot, mají největší zastoupení práce využívající metodu diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). V práci *Mori a spol. (2012)* bylo metodou DSC studováno uvolňování latentního tepla spojeného s transportem vody a s tvorbou intracelulárního resp. extracelulárního ledu. Naměřená data (termogramy) prezentují charakteristické oblasti: teplo uvolněné extracelulárním médiem, teplo uvolněné v průběhu transportu vody a teplo uvolněné během tvorby intracelulárního ledu při různých rychlostech chlazení. Na základě těchto dat byl diskutován relativní efekt transportu vody a tvorby intracelulárního ledu za různých rychlostí chlazení (0,5-250°C/min) a při různých hodnotách dílčích objemů buněk z celkového objemu suspenze buněk (0,2-0,8). Experimenty, týkající se životaschopnosti buněk po rozmrazení, využily metody korelační kryomikroskopie, která rovněž potvrdila interpretaci naměřených dat z DSC. V obou experimentech byly použity lidské dermální fibroblasty [59].

*Clarke a spol. (2013)* ve své práci zaměřené na definování nejnižší teploty, při kterých je ještě umožněna životaschopnost mikroorganismů (tzv. biofyzikální limit), také stanovil důležitost skelného přechodu neboli vitrifikace v rozmezí teplot -10 °C až -26 °C na samotné přežití mikroorganismů. K určení intracelulární teploty skelného přechodu ( $T_g$ ) byla opět využita metoda DSC, díky níž byla detekována vitrifikace jako kolísání tepelného toku spojené se změnou tepelné kapacity bez uvolnění latentního tepla. U kontrolních pokusů (médiu bez buněk), nebyl žádný signál spojený s vitrifikací prokázán [60]. Výhoda této metody spočívá nejen v malém množství vzorku a vysoké přesnosti měření, ale lze jí také prokázat existenci amorfni či krystalické fáze v tuhých disperzích za extrémních podmínek (vysoký tlak, nízké

teploty aj.) [61,62]. Mezi další metody, které byly ve studii použity, patří Ramanova spektroskopie umožňující jednoznačnou identifikaci jak chemických sloučenin, tak fázové přeměny. Dále byla využita mikroskopická metoda Kryo skenovací elektronová mikroskopie (KryoSEM), kde byla prozkoumána suspenze buněk a struktura ledu po ochlazení, konkrétně výskyt podchlazené vody s vysokou koncentrací rozpuštěných látek v důsledku tvorby krystalů ledu [60].

*Domínguez-díaz a spol. (2012)* zkoumali jak tepelné, tak i mechanické vlastnosti a mikrostruktury nejen PHB, ale i jeho kopolymerů s 5% a 12% obsahem poly(3-hydroxyvalerátu) (PHV). Použitím termogravimetrické analýzy (TGA) byly naměřeny hmotnostní změny v závislosti na vzrůstající teplotě. Tímto způsobem byla potvrzena větší tepelná stabilita kopolymerů, čímž je umožněno jejich zpracování v roztaveném stavu [63]. Jedná se o velmi jednoduchou a nenákladnou metodu, která udává velmi přesné výsledky umožňující značnou automatizaci, díky níž se snižuje pravděpodobnost vzniku chyb [64]. Vedle toho, metoda DSC prokázala posun teploty tání a krystalizace k nižším teplotám PHB s příměsí PHV. Mikrostruktura a tepelné přechody byly taktéž zkoumány prostřednictvím polarizační optické mikroskopie, která potvrdila sférolitickou morfologii polyhydroxyalkanoátů. U lamelárních struktur se využívá transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a mikroskopie atomárních sil (AFM) [65,66]. Další metoda, která byla využita ve studii PHA, je reologie, díky níž bylo mimo jiné zjištěno lineární viskoelastické chování kopolymerů PHB/PHV. Konkrétně PHB s 5% PHV vykazuje převážně elastické chování. Oproti tomu kopolymer s přídavkem 12% PHV již vykazuje chování viskózní [63]. Reologie se obecně zabývá mechanickými vlastnostmi látek jako je tokové chování kapalin či deformací tuhých těles za určitých podmínek (čas, teploty a tlak). K mnoha výhodám této metody dále patří porovnávání mechanických vlastností vzorků navzájem či potvrzení výsledků odlišných metod (Ubbelohdeho kapilární viskozimetr aj.) [67].

*Seki a spol. (2009)* studovali tvorbu intracelulárního ledu v závislosti na rychlosti chlazení s ohledem na přežití buněk, konkrétně kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Studovali teplotu, při které přejde podchlazená voda uvnitř buňky z kapalné do pevné fáze. Navrhli vztah mezi rychlostí chlazení a podchlazení buňky zahrnující dva parametry-propustnost vody a její teplotní závislost. Dále autoři tvrdí, že pro odvrácení tvorby intracelulárního ledu je nutno předejít podchlazení dehydratací. Při nukleaci probíhající za teploty  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , byla odhadnuta tvorba intracelulárního ledu při rychlosti chlazení větší než  $30\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Naproti tomu, při rychlosti chlazení  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  by neměl žádný intracelulární led vznikat. Všechny tyto předpoklady byly potvrzeny pomocí metody DSC, kdy byly při tvorbě intracelulárního ledu na termogramu zobrazeny dvě exotermie. Druhá exoterma odpovídající tvorbě intracelulárního ledu při opakovaném ochlazování zmizela, jelikož intracelulární led porušil plasmatickou membránu, čímž se též potvrdila bezpečná rychlost chlazení ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). Důsledkem měření bylo prokázáno úzké propojení tvorby intracelulárního ledu a přežití buněk s ohledem na rychlost chlazení a tak získání důležitých informací využitých v rámci kryokonzervace [68].

Ke studiu struktury a vlastností poly(3-hydroxybutyrátu) z hlediska jeho kryoprotektivních účinků se používá celá škála metod včetně různých režimů. Příkladem jedné z nich je metoda teplotně modulované DSC, kterou je možno aplikovat prostřednictvím dvou režimů – klasický režim tepelně modulované DSC a kvazi-izotermické teplotně modulované DSC neboli QITMDSC. Na rozdíl od standardního režimu DSC, má QITMDSC schopnost naměřit malou změnu teploty i za velkého tepelného toku [69,70,71].

Další možné využití technik v rámci zkoumání vlastností biopolymerů je technika rozptylu světla, kterou lze naměřit dynamický rozptyl světla (*Dynamic light scattering* – DLS) a elektroforetický rozptyl světla (*Electrophoretic light scattering* – ELS), přičemž DLS patří mezi nedestruktivní metody sloužící k definování velikosti disperzních (především kulových) částic. Oproti tomu, metoda ELS slouží ke zjištění zeta potenciálu (elektrický náboj dvojvrstvy), kdy velikost hodnoty zeta potenciálu značí stabilitu koloidního systému. Velmi důležitým faktorem ovlivňující zetu potenciál je pH koloidního systému [72]. Výhodou těchto technik je možná jejich vzájemné kombinace naměřených výsledů identických vzorků za použití automatické titrace. Další z mnoha metod využitelných ke zkoumání struktury a velikosti bakterií produkující PHB a samotného PHB, je fluorescenční mikroskopie, kdy prostřednictvím barviv (Nilská modř, Nilská červen) byly obarveny PHB granule a při určité excitační vlnové délce byla pozorována silně oranžová či žlutá fluorescence. Pomocí této metody byl například zjištěn fakt, že žijící buňky nesyntetizují PHB nahodile, nýbrž v určitých oblastech bakterií [73,74].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Klíčovým krokem řešení tématu diplomové práce byl výběr modelových bakterií, studovaných stresových faktorů a dále aplikovaných fyzikálně-chemických technik. Všechny tyto experimentální aspekty jsou shrnuty v následující kapitole.

#### 3.1 Použité bakterie, chemikálie a přístroje

##### 3.1.1 Použité bakterie

V experimentální části práce byly použity dva kmeny bakterií, *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup>. Bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 byl získán z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně. Oproti tomu kmen *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup> byl zakoupen v Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Německo.

##### 3.1.2 Chemikálie ke kultivaci mikroorganismů

NutrientBroth, (Himedia)

Agar Powder, (Himedia)

Dihydrogenfosforečnan draselný, (Sigma Aldrich Inc.)

Dihydrát hydrogenfosforečnan sodný, (Sigma Aldrich Inc.)

Síran amonný, (Sigma Aldrich Inc.)

Heptahydrát síranu hořečnatého, (Sigma Aldrich Inc.)

Fruktóza, p.a., (Lach-Ner, ČR)

Chlorid sodný, (Sigma Aldrich Inc.)

Chlorid draselný, (Sigma Aldrich Inc.)

Destilovaná voda

##### 3.1.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy, Boeco

Centrifuga, Boeco U-32R

Centrifuga, Hettich MIKRO 200

Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments

Temperovaná třepačka Heidolph1000, Labicom s.r.o

Termostat, LS-35

Vortex, Heidoplh Reax Top

Discovery HR-2, TA Instruments

NTEGRA Prima/Aura, NT-MDT

UV-VIS spektrometr, Hitachi U-3900H

Termogravimetrický analyzátor Q5000IR, TA Instruments

Koloidní analyzátor Zetasizer Nano Series, Malvern

Teplotně modulovaný kalorimetr DSC Q2000, TA Instruments

Fluorescenční korelační spektroskop, MicroTime 200, PicoQuant GmbH

Skenovací elektronový mikroskop Megellen 400/L, FEI

Transmisní elektronový mikroskop JEOL 1010



## 3.2 Kultivace

### 3.2.1 Skladování bakteriálních kultur a příprava inokula

Jelikož byly bakterie dodány v lyofilizovaném stavu, byly bakterie nejprve oživovány a kultivovány na Petriho miskách obsahující Nutrient Broth v termostatu nastaveného na 30 °C po dobu 7 dní. Po tomto časovém intervalu byly bakterie uchovávány při teplotě 4 °C. Přeočkování bakteriálních kultur bylo pravidelně zopakováno každých 30 dnů.

Inokulum pro bakteriální kultivace bylo připravováno do 100ml Erlenmayerových baňkách s obsahem 50 ml média Nutrient Broth, přičemž bylo natřikrát zaočkováno bakteriologickou kličkou z agarové plotny ve sterilním prostředí Laminárním boxu Aura mini. Poté bylo inokulum uchováno 24 hodin na temperované třepačce při frekvenci třepání 180 rpm a teplotě 30 °C. Následně bylo použito 5 obj. % na zaočkování produkčního minerálního a tzv. chudého (Nutrient Broth) média s ohledem na jejich celkový objem.

### 3.2.2 Živná média

Pro uchovávání bakteriální kultury bylo používáno pevné agarové médium Nutrient Broth (NB). Taktéž pro přípravu inokula bylo používáno submerzní médium NB.

Složení Nutrient Broth:

Beef extract	10 g·l <sup>-1</sup>
Pepton	10 g·l <sup>-1</sup>
NaCl	5 g·l <sup>-1</sup>
Agar	20 g·l <sup>-1</sup>

Složení minerálního produkčního média pro kultivaci bakterií *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup>:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,02 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,1 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
Fruktosa	20 g
*Roztok stopových prvků (viz níže)	1 ml
Destilovaná voda	1000 ml

Veškerá sterilizace médií byla prováděna v tlakovém hrnci se zavřeným ventilem po dobu 45 minut, zatímco sterilizace fruktózy byla uskutečněna v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem též po dobu 45 minut.

\*Roztok stopových prvků:

FeCl <sub>3</sub>	9,7 g
CaCl <sub>2</sub>	7,8 g
CuSO <sub>4</sub>	0,156 g
CoCl <sub>2</sub>	0,119 g
NiCl <sub>2</sub>	0,118 g
CrCl <sub>2</sub>	0,062 g
0,1 M HCl	1000 ml

### 3.3 Charakterizace morfologických odlišností bakterií prostřednictvím mikroskopických technik

Pomocí níže uvedených mikroskopických technik byly experimentálně stanoveny základní morfologické charakteristiky vzorků buněk, a to jak na povrchu buněk, tak i v intracelulárním prostoru.

#### 3.3.1 Transmisní elektronová mikroskopie

Příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) proběhla následujícím postupem. Nejprve bylo připraveno 250 ml produkční suspenze bakterií *C. necator* H16 v minerálním médiu a produkční suspenze bakterií *C. necator* PHB<sup>-4</sup> taktéž v minerálním médiu po 250 ml (viz. podkapitola 3.2.1). Z těchto suspenzí bylo několikrát odebráno po 10 ml suspenze buněk do centrifugačních zkumavek. Dále byla suspenze buněk centrifugována (10 000 rpm, 5 min), supernatant byl slit a resuspendovaná biomasa v 10 ml destilované vody byla opět stočena. Poté byl supernatant znovu slit, přičemž biomasa byla resuspendována ve 2 ml destilované vody a převedena do mikrozkuhavky Eppendorf, ve kterých byla rovněž stočena (14 000 rpm, 5 min). Supernatant byl slit a stěny mikrozkuhavky byly vysušeny, aby bylo dosaženo co nejmenšího množství extracelulární vody ve vzorku.

Samotná analýza vzorků byla provedena na pracovišti biologického centra AV ČR, České Budějovice, pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEOL 1010 při urychlovacím napětí 80 kV a zaznamenána za použití Mega View III CCD kamery (Olympus). Nejprve bylo nutno upravit buněčnou suspenzi tak, aby byl umožněn průchod elektronů. K suspenzi buněk byl přidán kryoprotektant (20% BSA (Fluka)) a následně se vzorek (cca. 0,2 µl) zmrazil ve vysokotlakém mrazáku (Leica EM pakt) ve speciálním nosiči. Dále byl přenesen pod kapalným dusíkem do zmrazené substituční jednotky (Leica EM AFS), při použití substitučního roztoku (2% oxid osmičelý v acetonu). Substituční proces začal při teplotě -90 °C a po 160 hodinách pomalého ohřívání skončil za teploty 4°C. Poté byl vzorek za laboratorní teploty infiltrován a zakotven v Polybedu (SPI, aceton a pryskyřice v poměrech 2:1; 1:1 a 1:2) po dobu 1 hodiny. Poté byl vzorek ponechán po celou noc v čistém fixujícím médiu za sníženého tlaku za použití exikátoru. Samotná polymerace byla provedena v časovém intervalu 48 hodin při teplotě 62 °C. Poslední úprava vzorku spočívala v nařezání ultratenkých řezů pomocí UltraCut UCT ultramicrotone (Leica) za použití diamantového nože (Diatome) s řezným úhlem 45°. Takto připravené řezy byly nakonec přeneseny na měděnou mřížku o 300 děr a obarveny uranylacetátovým a citrátem olovnatým roztokem.

### 3.3.2 Kryo skenovací elektronová mikroskopie

Vnitřní struktury bakteriálních kmenů *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> byly pozorovány prostřednictvím techniky kryo-SEM na Ústavu přístrojové techniky AV ČR, Brno. Pro přípravu vzorků byly tyto bakteriální kmeny kultivovány na Petriho miskách obsahující minerální médium. Kultury byly poté setřeny z agarových ploten a rychle zamrazeny pomocí kapalného dusíku. Před tímto šokovým zmrazením byly vzorky buďto ponechány při pokojové teplotě nebo předchlazeny na  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  či  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dále byly vzorky vloženy do kryo vakuové komory (ACE600, Leica Microsystems), kde byly zmrazené vzorky rozlomeny a krátce sublimovány při teplotě  $-95^{\circ}\text{C}$ . Takto vysušený vzorek byl přemístěn pomocí tzv. člunku za vysokého vakua do SEM (Magellen 400/L, FEI), vybaveném chladicím zařízením. Rozlomené vzorky byly tak pozorovány elektronovým paprskem o napětí 1 keV při  $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$  bez použití jakékoli metalové vrstvy na povrchu.

### 3.3.3 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (AFM), patřící mezi skenovací sondové mikroskopie (SPM), byla využívána pro charakterizaci topografie povrchu jednotlivých bakteriálních kultur *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup>. Měření byla prováděna pomocí mikroskopu NTEGRA Prima/Aura (NT-MDT) s ovládacím softwarem Nova. Vzorky byly skenovány v semikontaktním módu hroty NSG-03 (tuhost  $0,35\text{--}6,06\text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ , rezonanční frekvence  $47\text{--}150\text{ kHz}$  s poloměrem hrotu  $6\text{--}10\text{ nm}$ ) pomocí vzorkového podstavce, tzv. skenování vzorkem, za současného použití univerzální skenovací hlavy. Byly získány topografické a amplitudové snímky s rozlišením  $256\times 256$  bodů.

Samotná příprava vzorků byla z části totožná jako pro techniku TEM (podkapitola 3.3.1), co se týče centrifugací. Po převedení resuspendované biomasy ve 2 ml destilované vody do mikrozkuřavky Eppendorf bylo odebráno  $10\text{ }\mu\text{l}$  suspenze buněk, která byla opět resuspendována 10 ml fosfátového pufru (PBS). Z takto připravené suspenze byl dále odpipetován automatickou pipetou  $1\text{ }\mu\text{l}$  suspenze, který byl převeden na vyleštěný křemenný substrát ve sterilním prostředí laminárního boxu Aura mini. Vzorek byl následně ponechán ve sterilním boxu až do úplného vysušení.

#### Složení pufru PBS

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,44 g
Destilovaná voda	1000 ml

### 3.4 Stanovení mechanických vlastností bakteriálních kmenů

Mechanické vlastnosti bakteriálních kmenů, konkrétně porovnání viskoelastických vlastností v závislosti na teplotě, byly měřeny v rámci oscilačních reometrických analýz. Vzorky bakteriálních kultur *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivované jak v minerálním tak v NB médiu byly charakterizovány pomocí oscilačních testů na reometru Discovery HR-2 (TA Instruments) a softwarem Discovery HR-TA instruments TRIOS. Pro porovnání jednotlivých vzorků byly použity dva typy oscilačních testů, konkrétně deformační test za konstantní teploty (0 °C, -5 °C a -10 °C) s měnící se amplitudou deformace (0,01%-200%) a teplotní rampa s měnící se teplotou (v rozsahu od 5 °C do -15 °C) při konstantní amplitudě (0,1%) a frekvenci (1%) deformace. Měření teplotní rampy (0,5 °C/min) se skládalo ze dvou identických cyklů, kdy v každém cyklu měření probíhalo od 5 °C do -15 °C a zpět. Veškerá reometrická měření byla prováděna s geometrií deska-deska o průměru senzoru 40 mm.

Postup přípravy vzorků pro studium mechanických vlastností prostřednictvím reometrických měření byl naprosto stejný jako první část přípravy vzorků měřených metodou TEM, kdy bylo dosaženo co nejmenšího množství extracelulární vody ve vzorku a byla tak získána biomasa bakteriálních kmenů *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (viz. podkapitola 3.3.1). Poté byly jednotlivé vzorky postupně proměřeny nadávkováním z mikrozkuhavek Eppendorf na stacionární desku reometru.

### 3.5 Studium intracelulární vody metodami termické analýzy

Cílem využití metod termické analýzy bylo zjistit vliv přítomných PHB granulí v buňkách na chování intracelulární vody. Pro tyto experimenty byly použity bakteriální kultury *C. necator* H16 kultivované v minerálním a NB médiích, které byly připraveny naprosto stejně jako vzorky pro reometrické měření (viz. kapitola 3.4).

#### 3.5.1 Diferenční skenovací kalorimetrie

Diferenční skenovací kalorimetrie byla provedena v režimu teplotně modulované diferenční skenovací kalorimetrie za použití teplotně modulovaného kalorimetru DSC Q2000 (TA Instruments, Německo) vybaveného chladícím příslušenstvím RCS90. Vzorky byly umístěny do hermeticky uzavřených Tzero hliníkových pánviček. Experimenty zkoumající tepelný tok při zmrazení a rozmrazení vzorku buněk byly prováděny za klesající teploty od 20 °C do -50 °C a zpět při rychlosti 5 °C/min a teplotní modulaci  $\pm 1$  °C každých 60 s.

#### 3.5.2 Termogravimetrická analýza

Prostřednictvím termogravimetrické analýzy, která byla provedena pomocí přístroje TGA Q5000IR (TA Instruments), byly stanoveny procentuální úbytky hmotnosti vzorků v závislosti na vzrůstající teplotě (25 °C až 700 °C) za atmosféry suchého vzduchu s rychlostí ohřevu 10 °C/min.

Dále byly realizovány experimenty zaměřené na izotermické sušení vzorku při 60 °C. Vzorky buněk byly podrobeny tomuto sušení po dobu 40 min, poté byla teplota zvýšena na 200 °C za účelem stanovení celkového obsahu vody ve vzorku.

### 3.6 Charakterizace povrchových vlastností bakterií rozptylovými technikami

Stanovení povrchových vlastností bakteriálních kmenů *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných jak v minerálním tak v NB médiu, bylo prováděno prostřednictvím metod dynamického a elektroforetického rozptylu světla.

#### 3.6.1 Dynamický a elektroforetický rozptyl světla

Metoda dynamického rozptylu světla (DLS) byla využita ke stanovení distribuce velikosti částic. Měření probíhalo na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Metodou elektroforetického rozptylu světla byl naměřen na stejném přístroji také zeta potenciál. Měření obou metod bylo provedeno při měnícím se pH vzorku (cca od 7 do 2,5). Hodnota pH byla měněna řízeným přidavkem kyseliny HCl o koncentraci 0,1 M a zásady NaOH o koncentraci 0,1 M prostřednictvím automatického titrátoru (Malvern Instruments) Měření velikosti i zeta potenciálu byly podrobeny vzorky obou buněčných kmenů, tj. *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných jak v minerálním médiu, tak v Nutrient Broth médiu. Nejprve byla naměřena velikost a zeta potenciál jednotlivé buňky, přičemž každé měření bylo natřikrát zopakováno.

Příprava vzorků pro DLS a ELS analýzy probíhala obdobně jako pro předešlé techniky. Z připravené 2 ml suspenze buněk v mikrozkuhavce Eppendorf (viz. podkapitola 3.3.1) byl odebrán 0,5 ml suspenze a zředěn ultračistou vodou (cca 30 ml) na naměřenou optimální optickou hustotu 0,1 při vlnové délce 630 nm pomocí přístroje UV-VIS spektrometru (Hitachi U-3900H). Vzorky suspenze buněk byly poté odpipetovány na jednotlivá měření po 10 ml.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

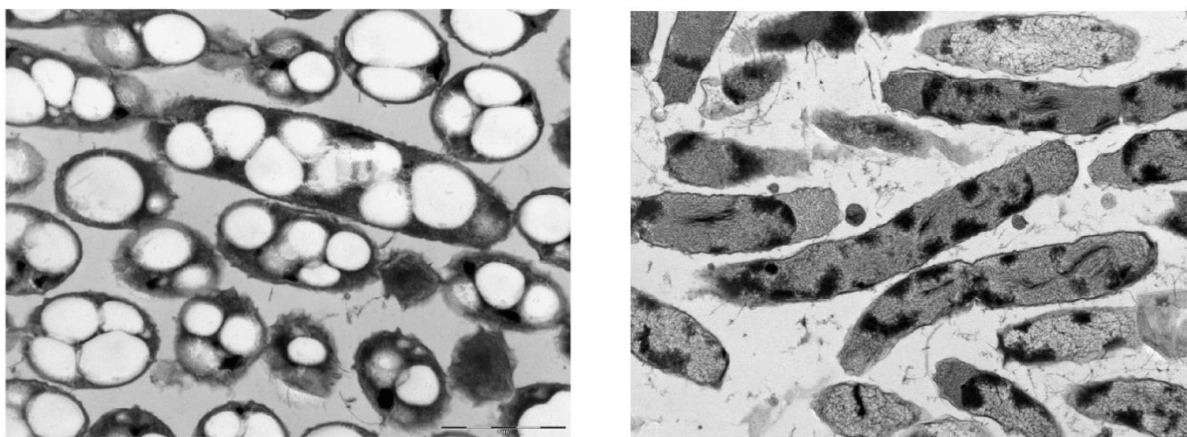
### 4.1 Porovnání mikroskopických metod

Jedním z dílčích cílů experimentální části této diplomové práce bylo srovnání výsledků více mikroskopických metod z hlediska posouzení morfologie buněk a uspořádání jejich intracelulárního prostoru.

#### 4.1.1 Transmisní elektronová mikroskopie

Snímky zobrazující PHB granule vyskytující se v intracelulárním prostoru bakteriálních kultur *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných po 72 hodin v minerálním médiu byly pořízeny pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEOL 1010 při urychlovacím napětím 80 kV a zaznamenány pomocí Mega View III CCD kamery (Olympus).

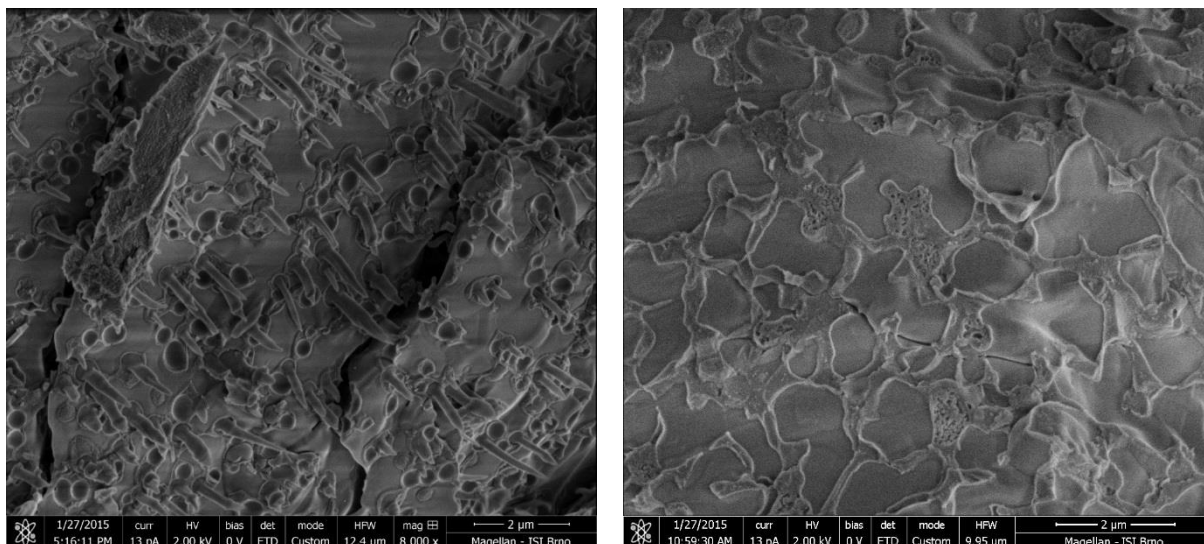
K výhodám této techniky patří zcela jistě zobrazení vnitřní struktury mikroorganismů a jejího uspořádání. Na snímcích je zřejmé velké množství PHB granulí (až 76% hmotnosti suché biomasy) v intracelulárním prostoru bakterií *C. necator* H16 na rozdíl od bakteriální kultury *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (0,6% hmotnosti suché biomasy) [75]. Nicméně jednou z nevýhod je nahodilá prostorová orientace bakterií v zobrazeném řezu, která způsobuje, že tato metoda neposkytuje přesnou informaci o konkrétním tvaru celých buněk, jelikož je nemožné připravit vzorek tak, aby všechny bakterie měly zcela horizontální polohu vůči procházejícímu paprsku elektronů. Z tohoto důvodu, jak jde vidět na snímcích (viz. Obr. 13), některé bakterie se v řezu zobrazují jako kulovité, ačkoliv má tento bakteriální kmen tvar tyčinkovitý.



**Obrázek 13** Snímky bakteriálních kultur *C. necator* H16 (vlevo) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (vpravo).

#### 4.1.2 Kryo skenovací elektronová mikroskopie

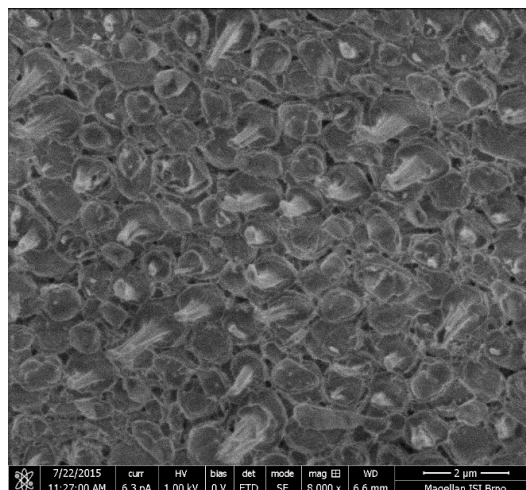
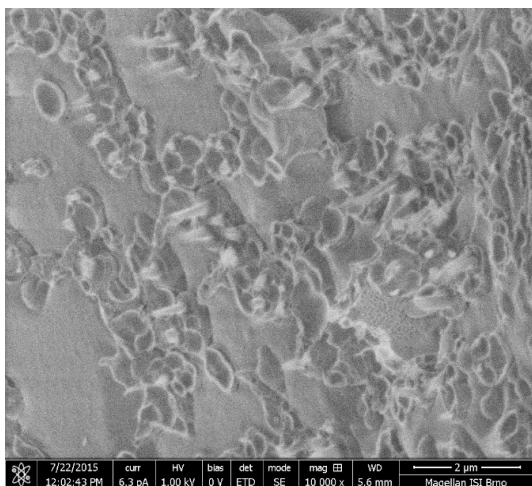
Další mikroskopická metoda, zabývající se morfologií a uspořádáním intracelulárního prostoru bakteriálních kmenů *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných v minerálním médiu, byla Kryo skenovací elektronová mikroskopie (Kryo-SEM) poskytující ultrastrukturální zobrazení vzorků v hluboce zmrazeném stavu. Vzorek je před zobrazením zlomen, díky čemuž je možné na rozdíl od standardní SEM techniky zobrazit i vnitřní strukturu buněk. V případě studovaných bakteriálních vzorků je tak možné se zaměřit i na morfologii PHB granulí (viz. Obr. 14).



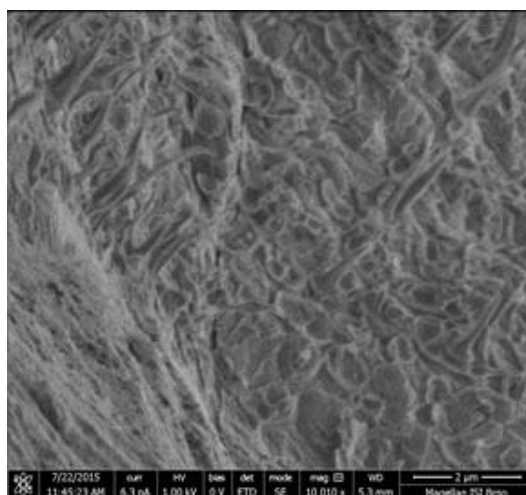
**Obrázek 14** Morfologické změny PHB granulí bakteriální kultury *C. necator* H16 (vlevo) a ultrastrukturní zobrazení bakterií *C. necator* PHB<sup>-4</sup> neobsahující PHB (vpravo).

Na snímku zobrazujícím morfologii bakterií obsahujících granule polymeru PHB (*C. necator* H16), byly pozorovány jehlicovité výběžky na rozdíl od snímku bakterie neprodukující tento polymer (*C. necator* PHB<sup>-4</sup>). Tyto morfologické deformace náleží právě PHB granulím. Podobné deformace u koloidních částic polymerních materiálů za extrémně nízkých teplot jsou pro tuto techniku známé (viz např. [76]). Specifická deformace PHB granulí naznačuje, že granule polymeru se za takto nízkých teplot vyznačují naprosto rozdílnými mechanickými a fyzikálně-chemickými vlastnostmi nežli jiné orgány v buňce (které se vyznačují křehkým lomením) či izolovaný PHB z bakteriálních buněk. Jednoznačný rozdíl představuje struktura a pružnost PHB; při zmrazení si PHB zachovává amorfni charakter a vykazuje prodloužení o více než 100%. Naproti tomu má polymer PHB izolovaný z buněk strukturu vysoce krystalickou a hodnota prodloužení dosahuje pouze cca 4 % [50].

Jednou z výhod metody Kryo – SEM je variabilita před přípravy vzorků před vlastním zmrazením. To nabízí zajímavé možnosti např. právě při studiu stresového zatěžování buněk. V této práci byl testováno konkrétně předchlazení vzorků na různou teplotu před šokovým zmrazením (nezbytným pro vlastní zobrazení). Byly porovnány vzorky připravené při třech různých teplotách: při laboratorní teplotě, při  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  a při  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cílem bylo ověřit, zda je metoda schopná zaznamenat i změny struktury buněk, které je možné očekávat při chlazení buněk (viz. kap. 1.2). Na získaných Kryo – SEM mikrofotografiích těchto vzorků nebyly patrné žádné jednoznačné odlišnosti (viz. Obr. 15 a 16). Pokud ke změnám struktury buněk (např. zmenšení objemu v důsledku transportu vody do extracelulárního prostoru) nebo PHB granulí (např. změna krystalinity polymeru) v průběhu chlazení dochází, tato metoda v testovaném provedení není k těmto změnám dostatečně citlivá.



**Obrázek 15** Zobrazení deformace PHB vzorků při předtemperaci na laboratorní teplotu (vlevo) a na  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (vpravo).

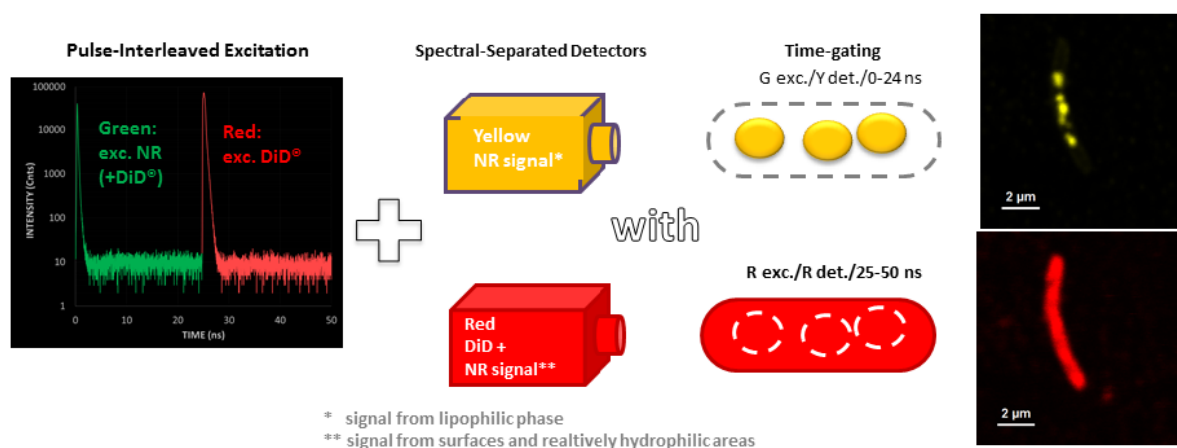


**Obrázek 16** Zobrazení deformace PHB vzorků při předtemperaci na  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.1.3 Fluorescenční mikroskopie

Za účelem komplexního srovnání mikroskopických technik při studiu morfologie mikrobiálních buněk jsou v následující kapitole zmíněny také aktuální výsledky testování fluorescenční mikroskopie, které byly na pracovišti předkladatelky získány paralelně k řešení této diplomové práce a byly nedávno publikovány [77]. V citované práci byla pomocí fluorescenční mikroskopie zkoumána morfologie buněk a PHB granulí v intracelulárním prostoru stejných bakteriálních kmenů jako v této diplomové práci - *C. necator* H16 (produkce PHB) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (bez produkce PHB) - kultivovaných po 72 hodin v minerálním médiu. Bakterie byly dvakrát promyty PBS pufrem, permeabilizovány studeným 20% etanolem po dobu 10 minut a opět promývány PBS pufrem před samotným barvením. Cílem fluorescenčního barvení bylo zobrazit zvlášť jednotlivé buňky a granule s PHB. Za tímto účelem byla použita selektivní fluorescenční barviva Nilská červeň a DiD. Pro 1 ml suspenze buněk byla spotřeba 1  $\mu\text{l}$  Nilská červeň (0,01 mg/ml) v DMSO a 1  $\mu\text{l}$  DiD (0,01 mg/ml) v acetonu. Po vlastním barvení byla suspenze buněk ponechána po dobu 30 minut ve tmě za laboratorní teploty. Dále bylo asi 10  $\mu\text{l}$  bakteriální suspenze napipetováno na krycí sklíčko a zalito 200  $\mu\text{l}$  2% agarózovým roztokem o teplotě  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ .





**Obrázek 17** Princip prostorového zobrazení PHB granulí a buněk pomocí fluorescenční mikroskopie dle [77].

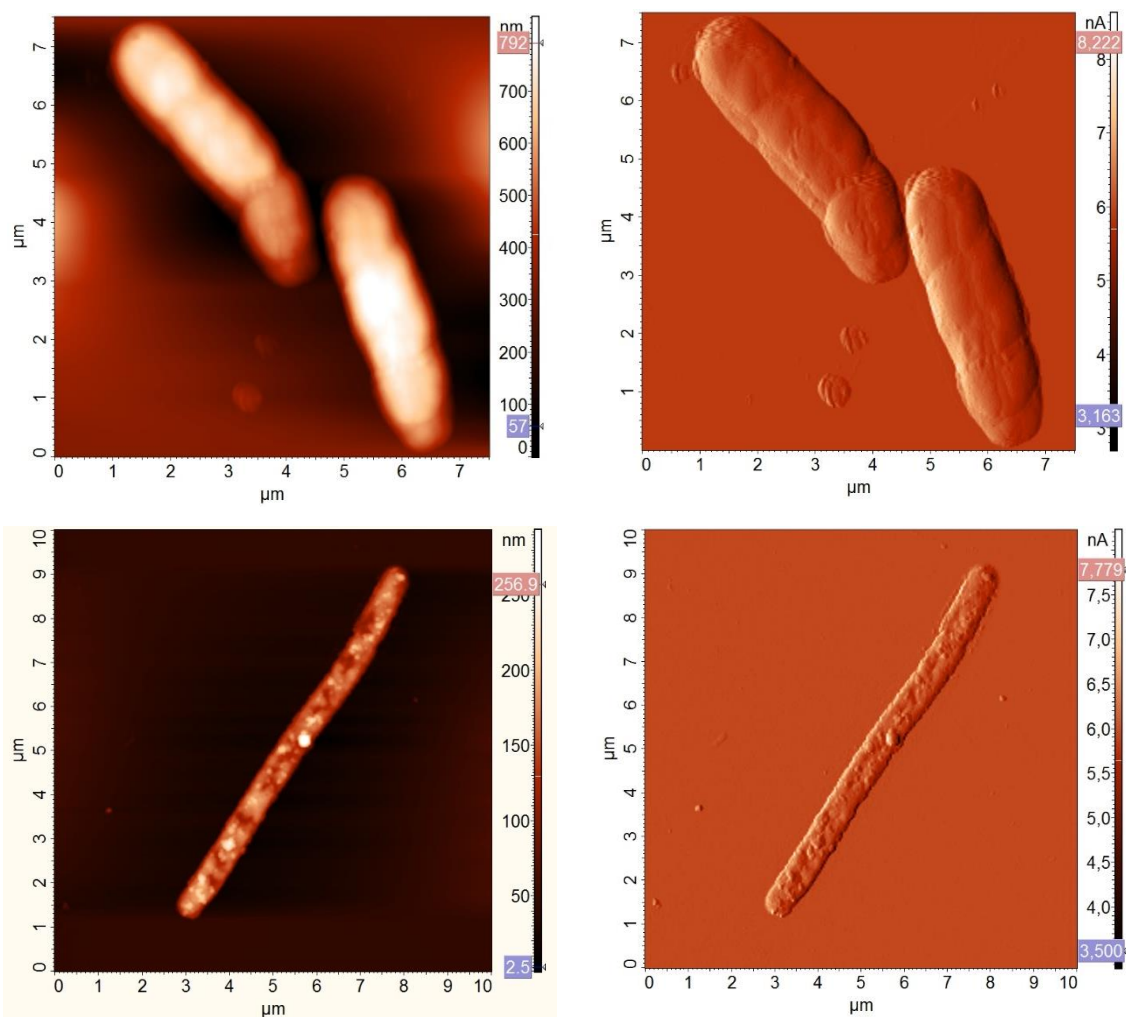
Princip selektivního zobrazení buněk a granulí spočívá v použití kombinace barviv s různým charakterem amfifilního DiD<sup>®</sup> a hydrofobní Nilské červeně. Zatímco DiD<sup>®</sup> - slouží jako membránová sonda, která se váže především na vnější povrch buněčné stěny, Nilská červeně je lokalizována zejména v nepolárních oblastech buňky – v granulích polymeru PHB, také uvnitř membrán nebo na proteinech. Získání 3 dimensionálních obrazů buněk a PHB granulí bylo dosaženo pomocí dvou různých obrázků z jednoho skenu, konkrétně prostřednictvím pulzní excitace lasery o rozdílných vlnových délkách a pomocí časově rozlišené detekce. Jak jde vidět na Obr. 17, použitím konfokální fluorescenční mikroskopické analýzy bylo dosaženo zobrazení v 3 dimenzionálních rozměrech jak PHB granulí tak i bakterií na rozdíl od technik TEM a Kryo-SEM. Tato technika také umožňuje určení rozměrů zobrazovaných útvarů (celých buněk vs. granulí PHB) na úrovni jednotlivé vybrané buňky.

#### 4.1.4 Mikroskopie atomárních sil

Paralelně k ostatním výše popsaným mikroskopickým technikám bylo cílem této diplomové práce ověřit potenciál využití mikroskopie atomárních sil (AFM) při charakterizaci topografie testovaných bakteriálních kmenů *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup>. Tato technika se běžně využívá k charakterizaci jedné či několika vrstev nanomateriálů, používá se kupříkladu k zjištění povrchových vad a ke kontrole morfologie v rámci polovodičového průmyslu [78,79,80]. Nicméně tato metoda má čím dál větší zastoupení i v dalších oblastech, například mikrobiologie, kde se AFM využívá k vizualizaci struktury povrchu jednotlivých buněk za fyziologických podmínek. Další možné využití je měření interakcí biomolekul a fyzikálních vlastností mikrobiálních povrchů [81,82].

Studované buněčné kultury byly opět kultivovány po dobu 72 hodin, a to konkrétně v minerálním a Nutrient Broth médiu. Výběr kultivačních médií byl volen tak, aby se porovnal jak vliv přítomnosti PHB polymeru tak kultivačních podmínek, z tohoto důvodu byla provedena dvojice porovnání – bakteriální kultura *C. necator* H16 kultivována v minerálním médiu (produkce PHB) ve srovnání s bakteriální kulturou *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovanou rovněž v minerálním médiu (bez produkce PHB) zobrazeno na. Obr. 18 a bakteriální kulturu *C. necator* H16 kultivovanou v minerálním médiu (produkce PHB) ve srovnání s bakteriální

kulturou *C. necator* H16 kultivovanou v médiu Nutrient Broth (bez produkce PHB) viz. příloha Obr. 39. Vzorek bakteriální kultury *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivován v médiu Nutrient Broth nebyl blíže zkoumán z důvodu minimální morfologické změny oproti kultivaci v minerálním médiu. Měření byla prováděna pomocí mikroskopu NTEGA Prima/Aura (NT-MDT) s ovládacím softwarem Nova. Z jednotlivých měření vzorků byly získány topografické a amplitudové snímky s rozlišením 256×256 bodů (viz. Obr. 18 a příloha Obr. 39 a Obr. 40). Přitom topografické snímky udávají skutečnou výšku vzorků v měřítku nanometrů popřípadě mikrometrů, zatímco amplitudové snímky jsou pořízeny prostřednictvím proudového signálu v jednotkách nA, který je nezbytný pro udržení konstantní amplitudy kmitání raménka v průběhu skenování topografických nerovností povrchu vzorku. Dalo by se tedy říct, že amplitudové snímky tak doplňují informace získané pomocí topografických snímků.



**Obrázek 18** Snímky bakterií kultivovaných v minerálním médiu, bakterie *C. necator* H16 (nahore) a bakterie *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (dole), kde topografické snímky jsou vlevo a amplitudové snímky vpravo.

Jak jde vidět na Obr. 18, bakterie *C. necator* H16 kultivována v minerálním médiu (produkce PHB) má více plastický vzhled nežli bakterie *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivována ve stejném médiu (bez produkce PHB). Dále se tyto bakteriální kultury velmi liší svojí velikostí, délka bakterie *C. necator* H16 kultivované v minerálním médiu činí cca 7 μm o šířce 750 nm ve srovnání s délkou bakterie *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivované taktéž v minerálním médiu, která se rovná

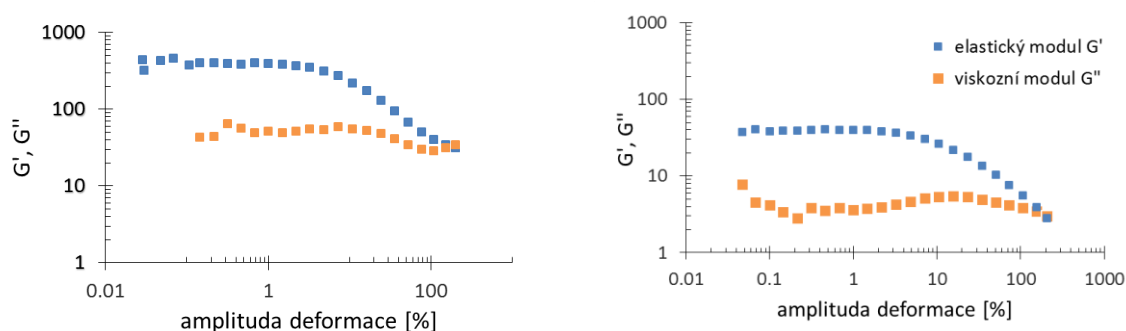
cca 10  $\mu\text{m}$  o šířce 200 nm. Právě rozdíl morfologie bakterií *C. necator* H16 kultivované v minerálním a v Nutrent Broth médiu je přisuzován výskytu PHB granulí v intracelulárním prostoru již zmíněných bakterií *C. necator* H16 kultivovaných v minerálním médiu, kdy jak bylo zjištěno [76], bakterie rostou v závislosti množství PHB uvnitř bakterie, tak aby granule PHB zaujímal cca 40 % objemu samotné bakterie. Změny morfologie bakterií mohly být také ovlivněny i předcházejícím volným vysušení vzorku.

Jednou z výhod této metody je její neinvazivní pozorování povrchu bakterií a získání tak podstatných informací o její velikosti, šířce a topografii jednotlivých buněk. K dalším výhodám této techniky patří ve srovnání s TEM a Kryo-SEM nejen rychlá příprava vzorků, ale i rychlé naměření jednotlivých skenů. Omezení této metody na měření suchých vzorků je také v současnosti u moderních AFM instrumentů již překonáno [82].

## 4.2 Stanovení a porovnání viskoelastických vlastností

### 4.2.1 Reometrická měření

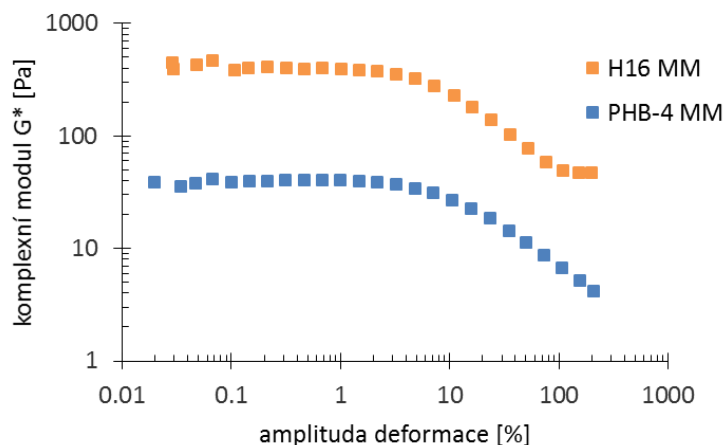
Cílem další části experimentů bylo posoudit možnosti charakterizace mechanických vlastností testovaných bakteriálních kultur (*C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivované v minerálním resp. Nutrient Broth médiu). Konkrétně byly sledovány základní viskoelastické parametry vzorků buněk stanovené oscilačními deformačními testy, a to v závislosti na amplitudě deformace (deformační testy) a na teplotě (teplotní rampa). Všechny experimenty byly prováděny na reometru Discovery HR-2 (TA Instruments) s ovládacím softwarem Discovery HR-TA instruments TRIOS za podmínek uvedených v kapitole 3.4.



**Obrázek 19** Závislost viskoelastických vlastností bakterií *C. necator* H16 MM (vlevo) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> MM (vpravo) na velikosti amplitudy deformace za teploty 0 °C.

Na obr. 19 je vidět, že při konstantní teplotě 0 °C v rámci oscilačního deformačního testu u vzorků obou bakteriálních kultur převládá chování elastického charakteru (*solid-like*). To je patrné z hodnot elastického modulu, které jsou o nejméně jeden řád vyšší nežli hodnoty viskózního modulu. Tento trend přetrvává až do dosažení určité meze vratné deformace, kdy při vyšší amplitudě deformace hodnoty elastického modulu klesají strměji než v případě modulu viskózního a u vzorku tak postupně roste viskózní příspěvek k deformačnímu chování. Stejný experiment byl realizován taktéž pro bakteriální kmeny pro *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivované v Nutrient Broth médiu (viz. příloha Obr. 41 a Obr. 42).

Pro přehlednější porovnání jednotlivých vzorků byl využit tzv. komplexní modul, vypočtený jako velikost komplexního čísla, které má reálnou složku v podobě elastického modulu  $G'$  a imaginární složku představuje viskózní modul  $G''$ . Komplexní modul představuje (podobně jako např. komplexní viskozita) univerzální charakteristiku rigidity měřeného vzorku.



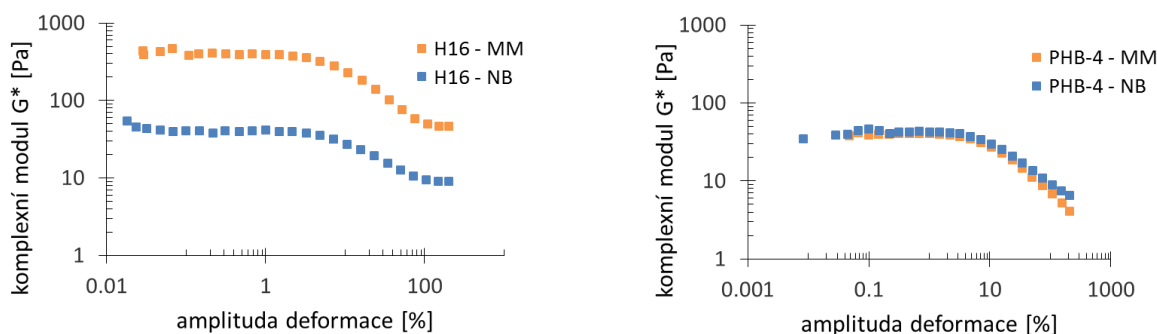
**Obrázek 20** Porovnání hodnot komplexního modulu  $G^*$  v závislosti na amplitudě deformace při teplotě  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$

Jak je vidět na Obr. 20, kultury *C. necator* H16 (produkce PHB) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (bez produkce PHB) kultivované v minerálním médiu vykazují markantní rozdíl v hodnotě komplexního modulu  $G^*$ . Tento rozdíl je možné přisuzovat výskytu PHB v buňkách. Tento fakt naznačuje, že granule polymeru mohou buňce poskytovat mechanickou oporu, která může hrát roli mimo jiné při stresu spojeném s mechanickým (nebo také např. osmotickým) namáháním buněk.

Data zobrazená na grafech 19 a 20 dále naznačují, že přítomnost granulí s polymerem PHB v buňkách kultury *C. necator* H16 nemá žádný viditelný vliv na začátek trvalé (nevratné) deformace. Přítomnost granulí tudíž sice mění celkovou tuhost buněk, neovlivňuje ovšem jejich stabilitu – k nevratné deformaci měřených vzorků dochází po překročení podobné amplitudy deformace (cca 10%).

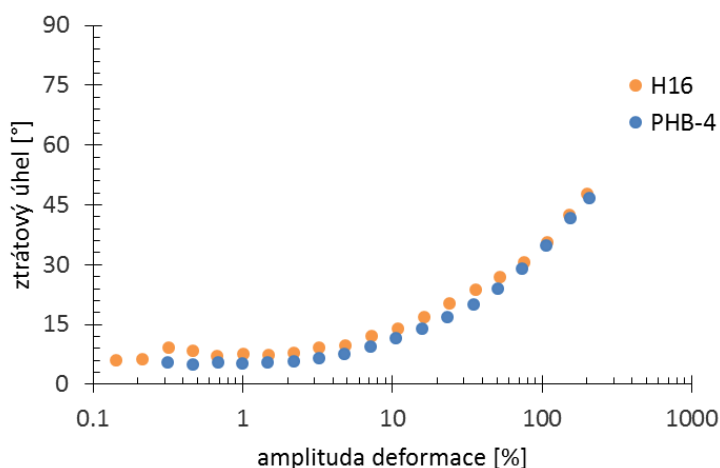
Výše zmíněný vliv granulí PHB na viskoelastické vlastnosti buněk se potvrdil také při experimentu, při němž byly oscilačním testům podrobeny bakterie kultivovaných v odlišném médiu, konkrétně v Nutrient Broth médiu, v němž ani kmen *C. necator* H16 neprodukuje a neakumulje polymer PHB. Na Obr. 21 je zobrazeno srovnání komplexních modulů obou buňčných kmenů – *C. necator* H16 (vlevo) a *C. necator* PHB-4 (vpravo), kultivovaných v obou typech kultivačního média. V případě kmenu *C. necator* H16 je vidět pokles hodnot komplexního modulu o jeden řád při kultivaci v Nutrient Broth médiu, v němž nedochází k akumulaci PHB. Tento fakt potvrzuje výše zmíněný vliv přítomností granulí PHB na tuhost buněk. Oproti tomu kultura *C. necator* PHB<sup>-4</sup> neprodukující polymer v minerálním ani v Nutrient Broth médiu (viz. Obr. 21 vpravo) vykazuje v obou médiích prakticky totožné hodnoty komplexního modulu. Tyto výsledky vylučují další efekty kultivačního média

na viskoelastické vlastnosti. Z výsledků lze tedy usoudit, že vliv kultivačních podmínek z hlediska médií na viskoelastické chování bakterií je minimální, čímž byly potvrzeny předešlé experimenty zaměřené na vliv přítomného PHB.



**Obrázek 21** Porovnání viskoelastického chování bakteriální kultury *C. necator* H16 (vlevo) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (vpravo) kultivovaných v minerálním a v Nutrient Broth médiu při teplotě 0 °C.

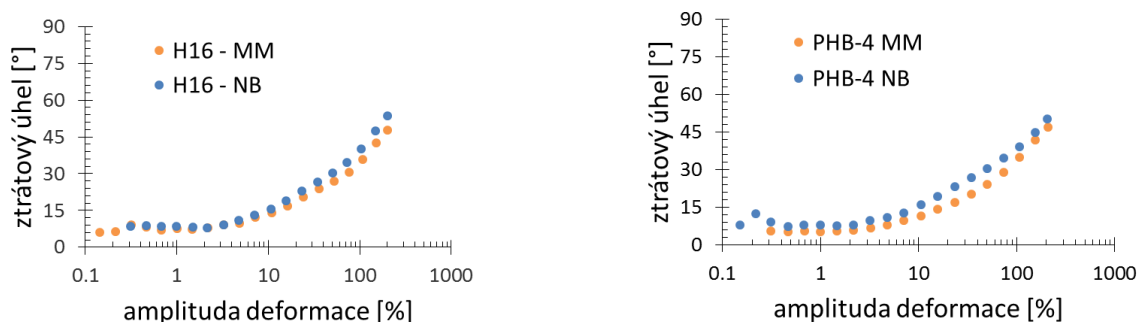
Vliv přítomnosti polymeru charakter deformace testovaných bakteriálních kmenů *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> dobře ilustruje také závislost ztrátového úhlu na vzrůstající amplitudě deformace. Jak je vidět na Obr. 22, charakter vzorků bakteriálních kultur jak *C. necator* H16 tak *C. necator* PHB<sup>-4</sup> produkovaných v minerálním médiu se nijak neliší z hlediska elastického (*solid-like*) či viskózního charakteru (*liquid-like*) s ohledem na přítomnost polymeru PHB. v rozsahu amplitud deformace 0,1 – cca 10 % se u obou vzorků projevuje především elastický charakter deformace (ztrátový úhel je velmi nízký), po zvýšení amplitudy deformace nad tuto hranici dochází k postupnému zvýraznění viskózního charakteru až k překonání hranice mezi spíše elastickým a spíše viskózním tělesem (ztrátový úhel roven 45 °) v oblasti nejvyšších testovaných amplitud. Také tato shoda závislosti ztrátového úhlu potvrzuje, že přítomnost PHB v buňkách zvyšuje pouze celkovou tuhost vzorku, nikoliv charakter jeho deformace.



**Obrázek 22** Porovnání charakterů viskozity a elasticity bakteriálních kultur *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných v minerálním médiu při teplotě 0 °C.

Další experimenty zabývající se porovnáním změn charakteru v závislosti na vzrůstající amplitudě deformace byly provedeny opět s bakteriální kulturou *C. necator* H16 při různých

kultivačních podmínkách, tj. kultivace v minerálním médiu (produkce PHB polymeru) a v médiu Nutrient Broth bez produkce polymeru PHB (viz. Obr. 23 nalevo). Podobný experiment byl také proveden s bakteriálním kmenem *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaným rovněž v minerálním i v Nutrient Broth médiu s tím rozdílem, že se porovnával vliv samotných kultivačních médií bez přítomnosti polymeru PHB (viz. Obr. 23 napravo). Stejně jako u předešlého experimentu (viz Obr. 24), do cca 10 % amplitudy deformace zůstávají hodnoty ztrátových úhlů nízké a až po překročení meze odpovídající ztrátovému úhlu 45° začíná převládat viskózní charakter nad elastickým.



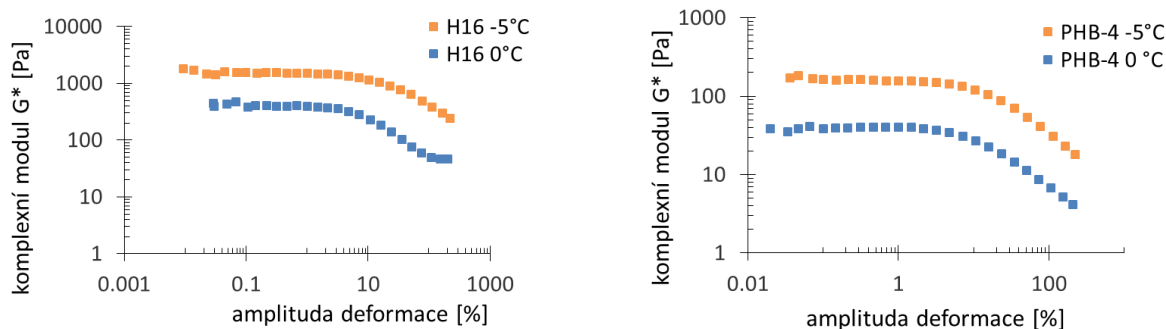
**Obrázek 23** Porovnání charakterů viskozity a elasticity bakteriálního kmene *C. necator* H16 (vlevo) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (vpravo) kultivovaných v minerálním médiu (MM) a v médiu Nutrient Broth (NB) při teplotě 0 °C.

Jak je patrné z Obr. 23, charakter bakteriálních kultur *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných jak v minerálním tak v Nutrient Broth médiu se opět nijak výrazně nelišili. Z tohoto důvodu, byl potvrzen vliv přítomnosti polymeru PHB v bakteriích pouze na jejich tuhost (odolnost) v průběhu jejich mechanického namáhání.

V rámci deformačních testů byly taktéž provedeny experimenty zabývající vlivem teploty, kdy byly porovnávány tři teploty (0 °C; -5 °C; -10 °C), při kterých byly experimenty realizovány. Ve srovnání s výše diskutovanými výsledky experimentů provedených při 0 °C, při teplotě -5 °C a -10 °C se hodnoty modulů stanovených pro jednotlivá opakování měření stejných vzorků výrazně lišila. Toto zjištění naznačovalo nižší reprodukovatelnost daných experimentů, jestliže je teplota měření pod rovnovážným bodem tuhnutí vody. To je zřejmě způsobeno tím, že u měřených vzorků při těchto nízkých teplotách docházelo k alespoň částečnému a nepravidelnému mrznutí vody. Protože mrznutí vody v komplexních materiálech je proces kineticky řízený, může u různých vzorků dojít k různému zamrznutí intracelulární vody (vliv otřesů, přítomnosti nukleačních krystalků ledu aj.).

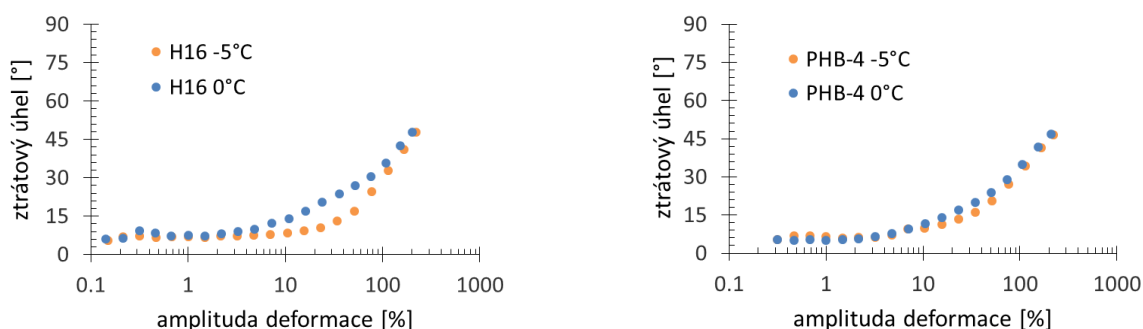
I přes nižší reprodukovatelnost vzorků měřených při -5 °C výsledky naznačují, že nižší teplota měření vede ke zvýšení celkové tuhosti vzorku charakterizované vyšší hodnotou komplexního modulu (viz Obr. 24).





**Obrázek 24** Srovnání naměřených komplexních modulů bakteriální kultury *C. necator* H16 (vlevo) a bakteriální kultury *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (vpravo) kultivovaných v minerálním médiu při teplotě 0 °C a -5 °C.

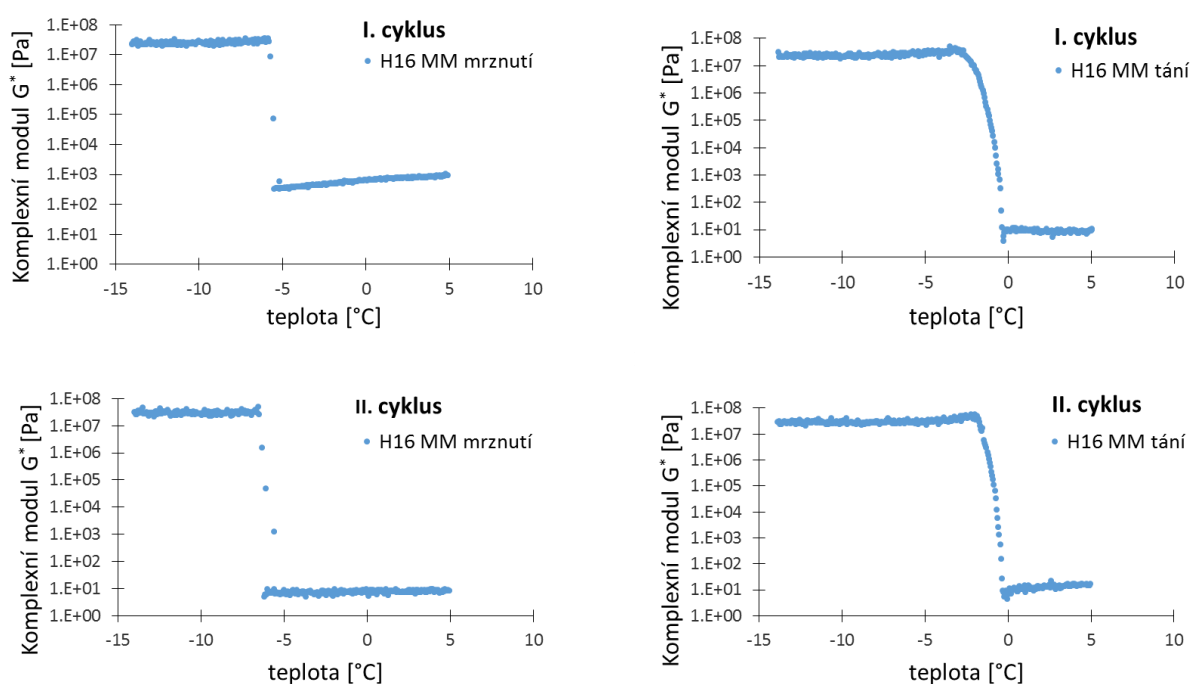
Naměřená data při teplotě -5 °C byla též zobrazena v závislost ztrátového modulu bakteriálních kmenů *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných v minerálním (viz. Obr. 25) na vzrůstající amplitudě deformace ve srovnání s naměřenými daty při teplotě 0 °C. Jak je vidět na Obr. 25, mezní bod, kdy se začíná zvyšovat příspěvek viskózní deformace, se snížením teploty nijak výrazně nezměnil.



**Obrázek 25** Porovnání viskózních a elastických charakterů bakteriálního kmene *C. necator* H16 (vlevo) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (vpravo) kultivovaných v minerálním médiu naměřených při teplotě 0 °C a -5 °C.

Totožné experimenty byly provedeny s bakteriálními kmeny kultivovanými v médiu Nutrient Broth (viz příloha Obr. 43 a Obr. 44), kde bylo dosaženo obdobných výsledků, které tak potvrdily závěry z předchozích experimentů zabývajících se vlivem kultivace v minerálním médiu a přítomnosti polymeru PHB v bakteriích. Experimenty prováděné při teplotě -10 °C nebyly zahrnuty v porovnání výsledků ostatních teplot, jelikož při této teplotě naměřená data vykazují velký rozptyl (viz. Příloha Obr 45). V tomto případě zřejmě v důsledku zmrznutí vody ve vzorku není vzorek dále použitelný k oscilačním reologickým testům, například z důvodu prokluzu na měřicích plochách.

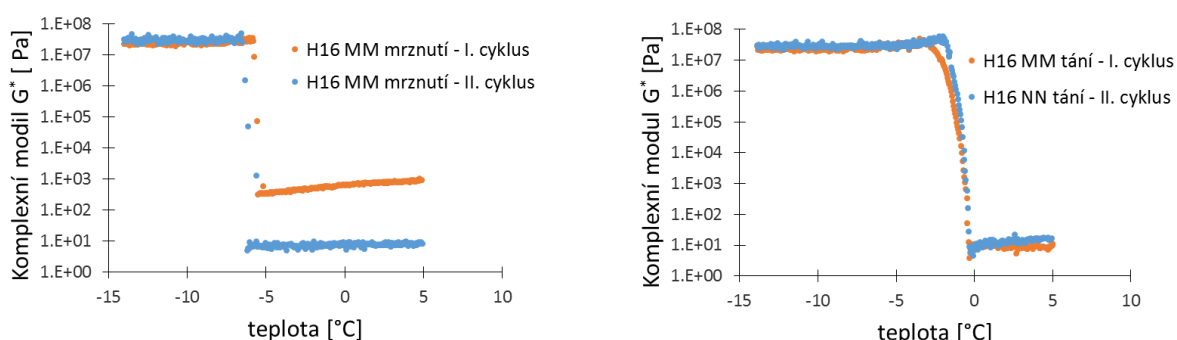
V další skupině oscilačních reologických experimentů (teplotní rampa) se měnila teplota vzorku při konstantní amplitudě deformace. Experimenty byly provedeny cyklicky (vždy dva cykly dále značené I a II). První cyklus zahrnoval chlazení vzorku bakteriální kultury v rozsahu teplot od 5 °C do -15 °C a následné zahřívání vzorku téže bakteriální kultury (od -15 °C do 5 °C). Druhý cyklus byl proveden naprosto stejně okamžitě po skončení prvního cyklu. Výsledky z kompletního jednoho měření (kultura *C. necator* H16 kultivovaná v MM médiu) jsou zobrazeny na Obr. 26. Je patrné, že v průběhu chlazení dochází při určité teplotě ke skokovému zvýšení komplexního modulu, které charakterizuje zmrznutí vody ve vzorku. K tomuto zmrznutí docházelo u různých opakování měření a u různých cyklů (I a II) při různých teplotách. Toto zjištění dobře koresponduje se závěrem, že mrznutí vody je ireverzibilní proces citlivý na ořesy a přítomnost nukleacních jader. Ve srovnání se strmým skokem změny komplexního modulu v průběhu mrznutí byl naopak zpětný pokles komplexního modulu v průběhu tání podstatně více pozvolný, což opět dobře ilustruje fakt, že tání je proces reverzibilní, podstatně méně ovlivněný kinetickými faktory oproti mrznutí.



**Obrázek 26** Naměřená data bakteriální kultury *C. necator* H16 kultivované v minerálním médiu, kdy horní grafy prezentují výstupy prvního cyklu a dolní grafy prezentují výstupy druhého cyklu.

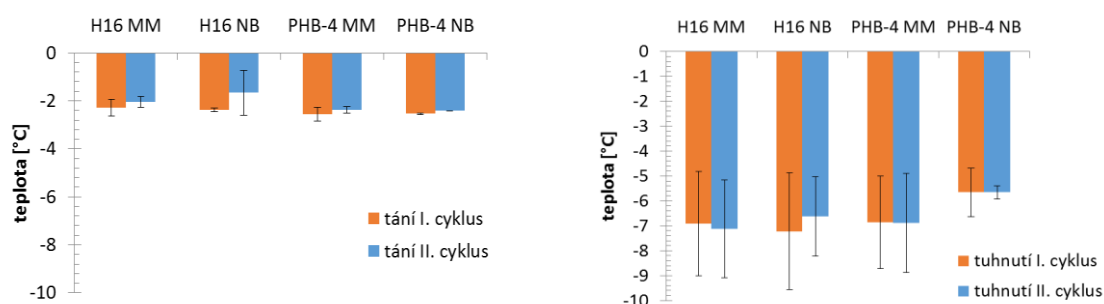


Pro lepší přehlednost byla naměřená data prezentující komplexní moduly bakteriální kultury *C. necator* H16 kultivované v minerálním médiu (produkce PHB) během krystalizace a tání vynesena do jednotlivých grafů (viz Obr. 27.). Jak je patrné z Obr. 27 (vlevo), během mrznutí došlo mezi prvním a druhým cyklem ke skoku v modulu kapalné fáze. Zároveň byl pozorován rozdíl teplot krystalizace mezi jednotlivými cykly. To je opět způsobeno faktem, že v případě mrznutí se jedná o ireverzibilní kineticky řízený proces, který je velmi ovlivnitelný z hlediska zmrznutí vzorku ve srovnání s táním (napravo), kde se průběh křivek naměřených pro jednotlivé cykly nijak nelišil. Experimenty měřené prostřednictvím teplotní rampy byly rovněž provedeny pro bakteriální kmeny *C. necator* H16 kultivované v médiu Nutrient Broth (bez produkce PHB) a bakteriální kmen *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaný v minerálním a Nutrient Broth médiích (v obou případech bez produkce PHB) viz příloha Obr. 46- 48.



**Obrázek 27** Porovnání změn komplexního modulu bakteriálního kmene *C. necator* H16 kultivovaného v minerálním médiu v průběhu mrznutí (vlevo) a tání jednotlivých cyklů (vpravo).

Dále byl vypočten ze tří opakovaných měření (provedených vždy pro čerstvý vzorek) průměr a směrodatná odchylka z teplot, kdy docházelo k přechodům jednotlivých skupenství, tj. body kdy vzorek začal tát či mrznout (viz Obr. 28). Na první pohled je zřejmé, že vzorky různých kultur ani vzorky kultivované v různých médiích se z hlediska teploty fázové přeměny nijak významně nelišily, ačkoli výsledky hodnot teplot v průběhu mrznutí jsou zatíženy chybou v důsledku už několikrát zmiňované ireversibility tohoto procesu.



**Obrázek 28** Porovnání teplot, kdy vzorek bakteriálních kultur *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných v minerálním a Nutrient Broth médiích začal tát (vlevo) či mrznout (vpravo).

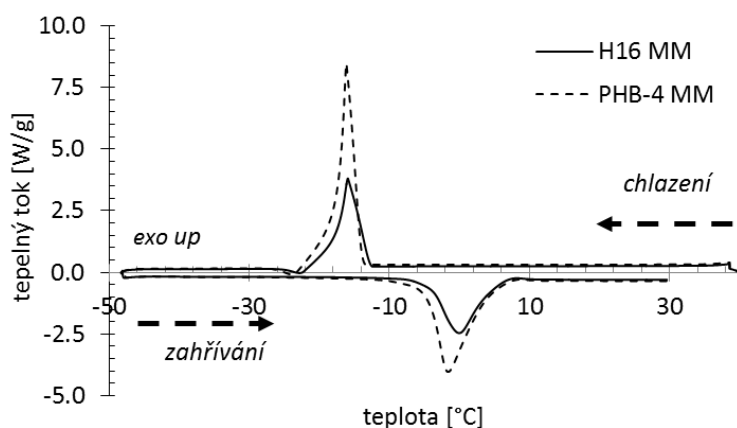
Tato kapitola experimentální části se věnovala zavedením a otestováním stanovení viskoelastických vlastností jednotlivých bakteriálních kultur *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných v minerálním a Nutrient Broth médiích prostřednictvím oscilačních testů (deformační, teplotní rampa), kdy byly stanoveny mechanické vlastnosti bakteriálních kultur v závislosti na teplotě či měnící se amplitudě deformace s ohledem na přítomnost polymeru (*C. necator* H16 kultivovaný v minerálním médiu) či druhu kultivačního média. Bylo zjištěno, že reologické měření je dobře aplikovatelné i na biologické vzorky, a to za různé teploty, kdy je možné sledovat průběh fázových přechodů (mrznutí a tání) těchto vzorků. Z konkrétních výsledků stanovených v rámci této kapitoly vyplynulo především, že obsah PHB granulí v buňkách zvyšuje jejich tuhost, ale neovlivňuje dostatečně průkazným způsobem stabilitu vzorku (deformaci, nutnou k dosažení nevratných změn ve vzorku), jeho deformační charakter (viskózní resp. elastický) ani teploty, při nichž k fázovým přechodům dochází.

### 4.3 Termická analýza

Metody termické analýzy byly zahrnuty v testovaných fyzikálně-chemických technikách především proto, že umožňují sledovat změny stavu vody v testovaném vzorku, a to ať už z hlediska jejích fázových přeměn, tak i z hlediska transportu mezi jednotlivými fázemi. Testování vybraných technik termické analýzy proběhlo opět na vzorcích bakteriálních kultur *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup>, kultivovaných tomto případě pouze v minerálním médiu.

#### 4.3.1 Diferenční skenovací analýza

Charakterizace fázových přechodů intracelulární vody během chlazení a zpětného zahřívání jednotlivých vzorků bakteriálních kultur *C. necator* H16 (produkce PHB) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (bez produkce PHB) kultivovaných v minerálním médiu byla provedena prostřednictvím techniky diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) na přístroji DSC Q2000, TA Instruments.

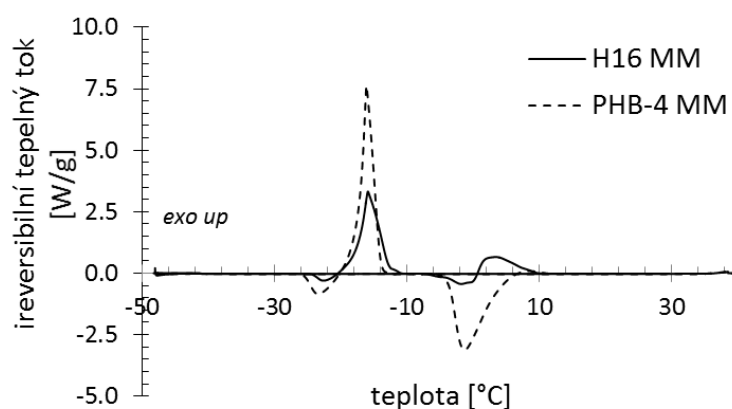


**Obrázek 29** DSC termogram vzorků bakteriální kultury *C. necator* H16 (produkce PHB) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (bez produkce PHB) kultivovaných v minerálním médiu.

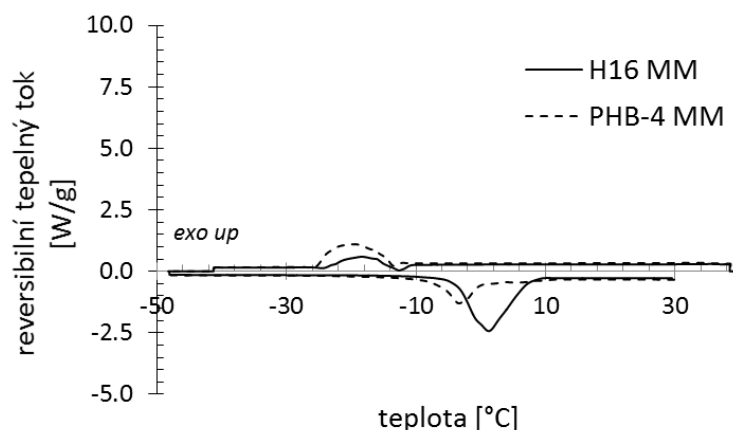
Výstup měření pomocí metody DSC je zobrazen na Obr. 29, kde jsou porovnány dva naměřené termogramy TMDSC vzorků bakteriální kultury *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných v minerálním, kde jednotlivé exotermní a endotermní píky představující zmrznutí a tání vzorků. Přitom poloha píků udává rozsah teplot fázových přechodů a plocha píků představuje množství spotřebovaného (tání) či uvolněného (mrznutí) tepla. Při vyhodnocení vlivu PHB na fázové přechody vody v buňkách byl brán v potaz pouze endotermní pík odpovídající tání zmrzlé intracelulární vody, protože mrznutí vody se také při DSC analýze vyznačuje malou reprodukovatelností a tudíž i menší věrohodností informací ohledně skupenských přechodů vody. Při měření DSC termogramů se vzorek nemíchá, proto dochází k podchlazení vody pod rovnovážnou teplotu. Okamžik, kdy dojde ke zmrznutí vody je v takovém případě velmi citlivý k drobným otřesům nebo k přítomnosti nukleačních jader (např. prachových částic). Oproti tomu, tání vody je proces vratný, reprodukovatelný a dochází k němu v momentu, kdy vzorek dosáhne rovnovážné teploty.

Jak už bylo řečeno výše, plocha endotermního píku reprezentuje celkové množství tající vody. Plocha píku je na první pohled menší s výskytem polymeru PHB v bakterii nežli u kmenu bez jeho produkce, což odpovídá nižšímu relativnímu obsahu vody v intracelulárním prostoru buněk s obsahem PHB granulí. Další odlišnost naměřených endotermních píků jednotlivých vzorků představuje posun endotermie tání k vyšší teplotě v případě vzorku s PHB, což poukazuje na změnu aktivity vody ve vzorku. Posun celého endotermního píku vzorku s polymerem PHB, nejen vrcholu ale i počátečního bodu endotermie, byl experimentálně opakovaně prokázán. Konkrétní hodnota posunu počátečního bodu endotermie závisí například na rychlosti zahřívání, nicméně posun vrcholu endotermie vzorku obsahující polymer PHB zobrazený na Obr. 29 se rovná 1,5 °C. Tento posun může být zapříčiněn sníženou hydratací intracelulární vody k již zmíněnému polymeru PHB vyskytující se uvnitř bakterií ve formě granulí (více v podkapitole 3.3.2).

Velká výhoda TMDSC techniky oproti konvenční DSC je schopnost oddělit z celkového naměřeného tepelného toku signál vratných a nevratných dějů, jak můžeme vidět na Obr. 30, kde je zobrazeno rozdělení signálu, zobrazeného na Obr. 29, na tyto dvě složky.



**Obrázek 30** Ireverzibilní složka signálu zobrazeného na Obr. 29.



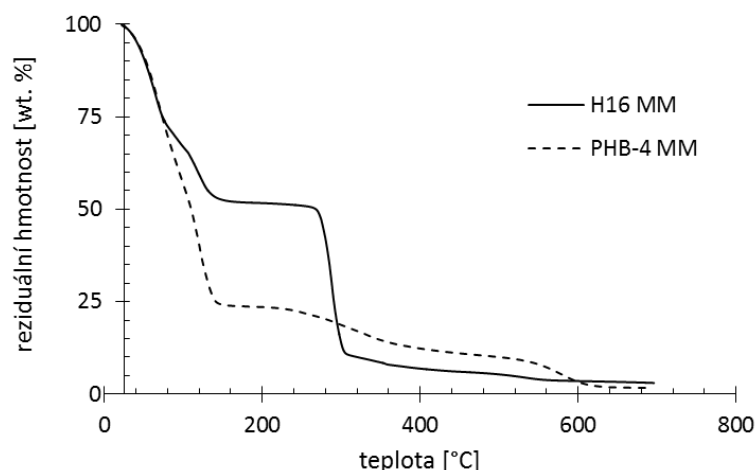
**Obrázek 31** Reverzibilní složka signálu zobrazeného na Obr. 29.

Jak je vidět na Obr. 30, rozdělením signálů toků bylo potvrzeno, že mrznutí intracelulární vody je prakticky výhradně nevratným procesem. Kromě toho byly odhaleny další odlišnosti ohledně nereversibilního signálu procesu tání zmrzlé intracelulární vody mezi vzorky obsahující polymer PHB a bez polymeru PHB (viz. Obr. 31), kdy je děj více reversibilní v přítomnosti polymeru PHB. Dále byl zjištěn velký rozdíl ve velikosti signálu tání nereversibilní složky vzorku bez polymeru PHB ve srovnání se signálem vzorku obsahující polymer PHB. Tento rozdíl píků je opět přisuzován předpokladu o rozdílné hydrataci buněčných komponent. Větší míra hydratace je patrná u bakteriálního vzorku neobsahující žádný PHB, tj. *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaný v minerálním médiu zahrnující přítomné granule polymeru PHB.

#### 4.3.2 Termogravimetrická analýza

Druhá dílčí část věnovaná termické analýze v rámci experimentální části této diplomové práce bylo posouzení možnosti využití termogravimetrické analýzy (TGA). TGA analýzy byly realizovány pomocí přístroje TGA Q5000IR (TA Instruments) za účelem stanovení úbytku hmotnosti vzorků bakteriální kultury *C. necator* H16 (produkce PHB) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (bez produkce PHB) kultivovaných v minerálním médiu v závislosti na vzrůstající teplotě (25 °C až 700 °C) za atmosféry suchého vzduchu s rychlostí ohřevu 10 °C/min (viz Obr. 32) nebo v závislosti na času při konstantní teplotě, kdy byl experiment zaměřený pouze na ztrátu vody z buněčných vzorků (viz Obr. 33).

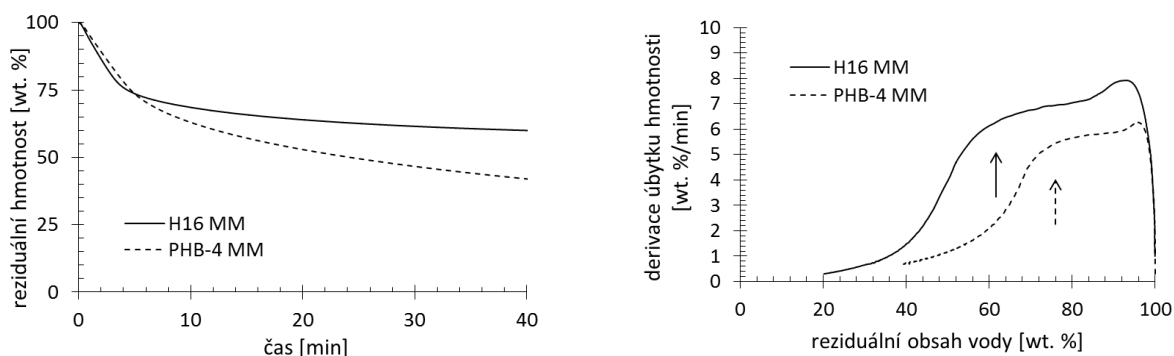
Jak je vidět na Obr. 32, pokles hmotnosti vzorků jak u buněk s polymerem PHB tak i bez něj nabývá konstantních hodnot kolem 200 °C, kdy se ze vzorků odpařila nejen volná, ale i hydratovaná intracelulární voda, přičemž viditelný rozdíl mezi residuální hmotností vzorků při této teplotě spočívá v relativním procentuálním obsahu intracelulární vody s ohledem na přítomnost polymeru PHB v buňkách. Další významnou oblastí je zlom ustálených hodnot (cca 300 °C až 600 °C), kdy dochází ke spalování organické hmoty. Residuální hmotnost vzorku při vyšší teplotě představuje nespalitelný podíl buněk.



**Obrázek 32** Termogravimetrická analýza vzorků bakteriální kultury *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných v minerálním médiu za vzrůstající teploty.

Z termogramů uvedených na obr. 32 dále vyplývá, že úbytek hmotnosti při teplotě cca 300 °C je výrazně vyšší pro vzorek *C. necator* H16. Jelikož v této oblasti teplot dochází k úbytku hmotnosti v důsledku spalování labilních organických složek, dá se usuzovat, že tento pokles odpovídá oxidaci PHB.

Dále byly v rámci termogravimetrické analýzy provedeny experimenty zaměřené na izotermální sušení vzorku při konstantní teplotě 60 °C. Na Obr. 33 (vlevo) jsou zaznamenány sušící křivky stejných vzorků jako u předchozích experimentů, tj. vzorky bakteriálního kmene *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných v minerálním médiu.



**Obrázek 33** Izotermická termogravimetrická analýza vzorků bakteriální kultury *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných v minerálním médiu při teplotě 60 °C (vlevo) a zobrazení rychlosti sušení v závislosti na reziduálním obsahu intracelulární vody (vpravo).

Z obr. 33 (vlevo) je patrné, že největší pokles hmotnosti vzorků je na počátku experimentálního měření (během prvních cca deseti minut), kdy dochází k odpaření volné extracelulární vody. Jak je patrné ze zobrazených sušících křivek, další fáze sušení se liší u vzorků obsahující polymer PHB a vzorku bez polymeru PHB, u vzorku obsahující polymer PHB je sestup sušící křivky více mírný ve srovnání s poklesem sušící křivky vzorku bez polymeru PHB. Tento rozdíl opět způsoben odlišným množstvím sušiny ve vzorku

bez resp. s PHB. Po uběhnutí 40 minut izotermického sušení byly vzorky dosušeny při teplotě 200 °C po dobu 10 minut, aby mohl být vypočten celkový obsah vody.

Výsledky sušícího experimentu byly dále analyzovány způsobem, navrženými autory publikace [83]. Na Obr. 33 vpravo jsou sušící křivky vyneseny, v podobě závislosti rychlosti sušení (časová derivace úbytku hmotnosti) na procentuálním obsahu vody ve vzorku (vypočtené z celkového obsahu vody, stanoveného dosušením při 200 °C). V grafu jsou naznačeny kritické body (šipky), kdy se výrazně mění závislost rychlosti sušení. Dle autorů [83] je důvodem změny mechanismu vypařování vody počátek sušení intracelulární vody. Kritické body tak umožňují rozdělení celkového množství vody ve vzorku na vodu extracelulární a intracelulární.

V této části experimentální náplně diplomové práce bylo ověřeno, že metody termické analýzy představují cenný nástroj při studiu buněčných vzorků. Zatímco metoda DSC poskytuje řadu informací o aktivitě a fázových přechodech vody ve vzorku, TGA analýzu lze využít mimo jiné při stanovení celkového množství intracelulární vody.

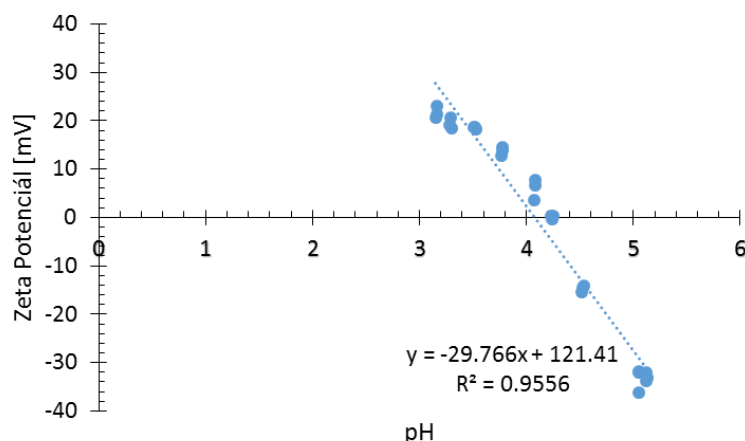
#### **4.4 Stanovení distribuce velikosti částic a zeta potenciálu**

Poslední experimentální směr realizovaný v rámci této práce se zaměřil na využití technik analýzy koloidních systémů při charakterizaci suspenzí mikrobiálních buněk.

Stanovení distribuce velikosti částic v buněčné suspenzi bylo provedeno pomocí metody dynamického rozptylu světla (DLS), zeta potenciál byl naměřen prostřednictvím metody elektroforetického rozptylu světla. Kombinace těchto dvou metod byla naměřena pomocí přístroje Zetasizeru Nano ZS (Malvern Instruments). Informace o velikosti a povrchovém elektrokinetickém potenciálu buněk ve vodném prostředí za různých podmínek může být velmi cenné např. při studiu agregace buněk (např. v souvislosti se vznikem biofilmu) atd.

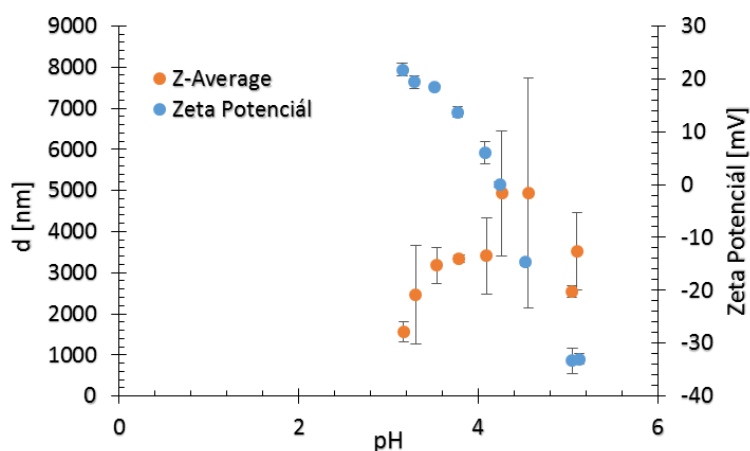
Měření bylo realizováno při proměnlivé hodnotě pH suspenze buněk za použití automatického titrátoru (příslušenství Zetasizeru Nano ZS). V experimentální části zabývající se distribucí velikosti a zeta potenciál buněk byly opět testovány bakteriální suspenze bakteriálních kmenů *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovanými v minerálním a Nutrient Broth médiu.

Kombinace metod dynamického elektroforetického rozptylu světla patří mezi standardní metody charakterizující stabilitu proteinů. V této experimentální části diplomové práce byly tyto metody použity pro stanovení izoelektrického bodu buněk, tj. hodnoty pH, kdy membrány bakteriálních buněk budou vykazovat nulový efektivní náboj. Zároveň s měřením zeta potenciálu prostřednictvím elektroforetického rozptylu světla byla měřena i distribuce velikosti částic pomocí DLS. Měření byla prováděna za kontinuální titrace (od hodnoty pH cca 6 do 3). Jak je vidět na Obr. 34, hodnota izoelektrického bodu bakteriální suspenze *C. necator* H16 kultivovaná v minerálním médiu (produkce polymeru) se rovná 4,24.



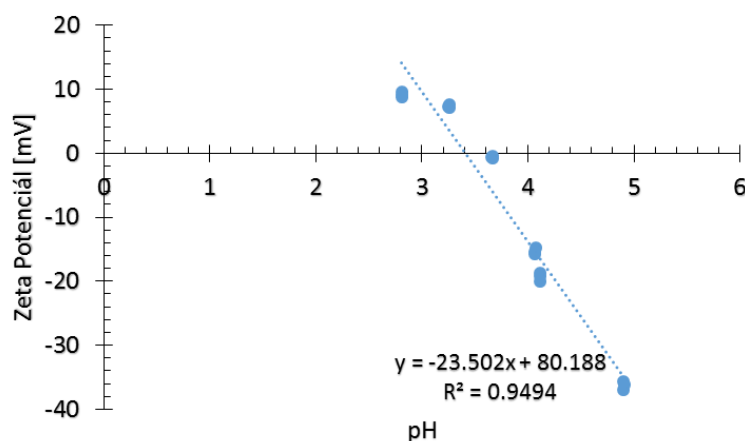
**Obrázek 34** Stanovení izoelektrického bodu suspenze *C. necator* H16 kultivované v minerálním médiu

Jak už bylo zmíněno výše, měření distribuce velikosti buněk bylo provedeno paralelně k měření zeta potenciálu. Na Obr. 35 je patrné, že došlo k agregaci buněk, jakmile membrány buněk dosáhly izoelektrického bodu. Z těchto výsledků je patrné, že při pH mimo tuto hodnotu je náboj buněčné stěny dostatečně velký na to, aby zabránil výrazné agregaci buněk. Nicméně je třeba mít na paměti, že pro určení absolutní velikosti buněk je tato metoda nevhodná, jelikož přepočítává velikost buněk na kulovité částice, přičemž tvar použitých bakterií je tyčinkovitý, jak jde vidět v kapitole 3.1.

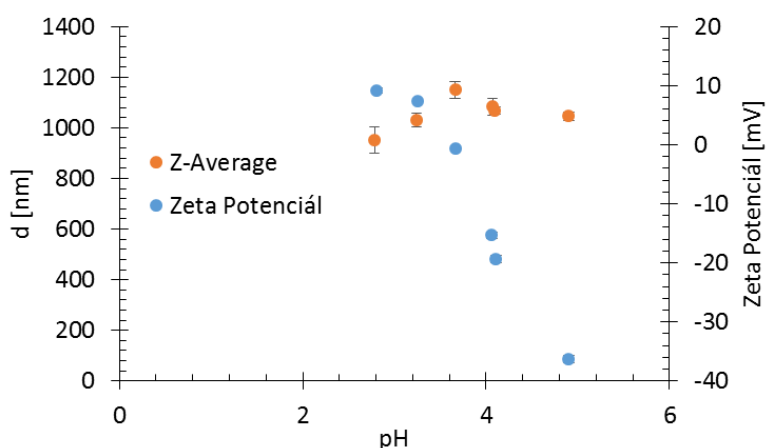


**Obrázek 35** Agregace buněk *C. necator* H16 kultivovaných v minerálním médiu za izoelektrického bodu

Dále byly provedena totožná měření i bakteriálních suspenzí *C. necator* H16 kultivovaného v Nutrient Broth médiu (bez produkce PHB). Naměřený izoelektrický bod *C. necator* H16 neobsahující polymer PHB se nijak výrazně nelišil od vzorku *C. necator* H16 kultivovaného v minerálním médiu (produkce polymeru PHB), na rozdíl od velikosti agregátů vznikajících v izoelektrickém bodě, která se byla stanovena ve vzorku obsahující polymer PHB na cca 5000 nm (viz. Obr. 35), u vzorku bez přítomnosti polymeru PHB v buňkách byla hodnota stanovena kolem hodnoty 1200 nm (viz Obr. 37).



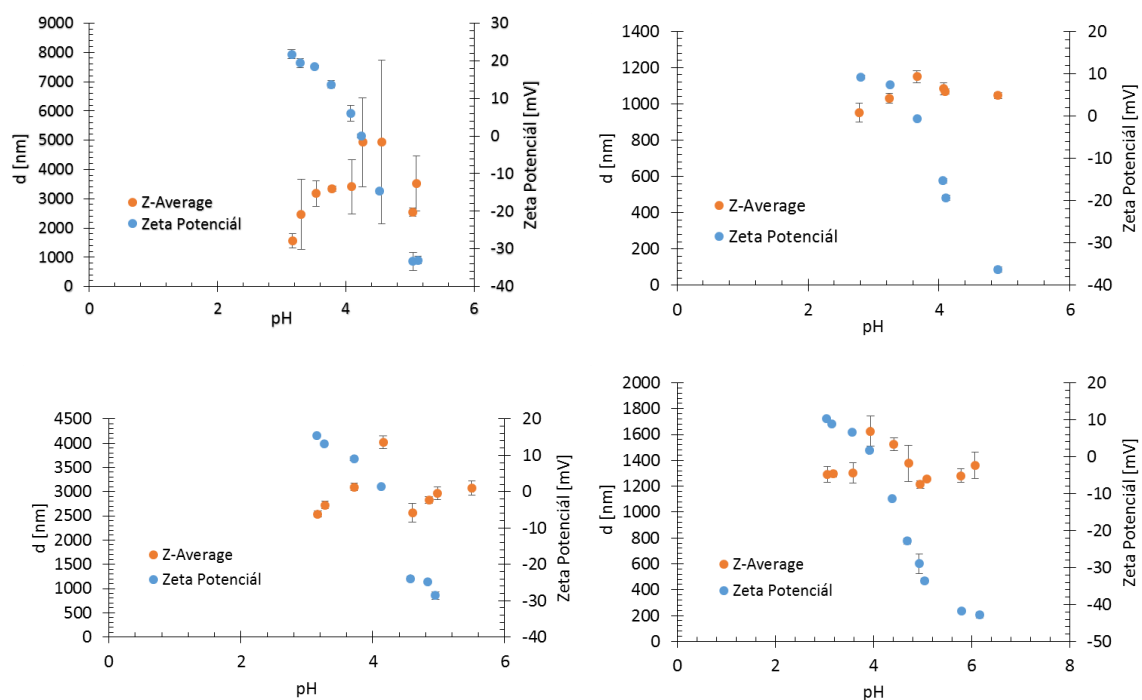
**Obrázek 36** Stanovení izoelektrického bodu suspenze *C. necator* H16 kultivovaného v médiu Nutrient Broth



**Obrázek 37** Agregace buněk *C. necator* H16 kultivovaných v Nutrient Broth médiu za izoelektrického bodu

Předcházející experimenty byly pro ověření výsledků několikrát zopakovány (celkem 5krát). Totožné experimenty byly také provedeny s bakteriálním kmenem *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaným jak v minerálním (bez produkce polymeru PHB) tak v médiu Nutrient Broth (bez produkce polymeru PHB) viz. Příloha Obr. 49-52. Výsledky experimentů se vzorky bakteriálního kmene *C. necator* PHB<sup>-4</sup> prokázaly stejný trend jako u předešlých experimentů se vzorky bakteriálního kmene *C. necator* H16, což značí zanedbatelný vliv polymeru PHB na povrchový náboj a agregační chování buněk. Naopak je zřejmé, že velikost agregátů je podmíněna kultivačními podmínkami (viz Obr. 38).





**Obrázek 38** Porovnání povrchových charakteristik suspenze buněk *C. necator* H16 kultivovaných v minerálním médiu (vpravo nahoře), v Nutrient Broth médiu (vlevo nahoře) a *C. necator* PHB<sup>4</sup> kultivovaných v minerálním médiu (vpravo dole) a v médiu Nutrient Broth (vlevo dole).

## 5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo ověřit využitelnost fyzikálně-chemických analýz při vlivu stresových faktorů na mikroorganismy, konkrétně na bakteriální kmeny *Cupriavidus necator* H16 a její mutantní kmen *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup> které se liší ve schopnosti resp. neschopnosti produkovat a akumulovat polyhydroxybutyrát jako zásobní polymer ve formě intracelulárních granulí.

Jedním z dílčích cílů experimentální části této diplomové práce bylo srovnání různých mikroskopických metod z hlediska posouzení a charakterizace morfologie bakterií a uspořádání jejich intracelulárního prostoru v závislosti na přítomnosti granulí polymeru PHB. Nejprve byly pořízeny snímky pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) zobrazující vnitřní struktury mikroorganismů. Nicméně jedna z nevýhod zobrazení prostřednictvím této mikroskopické techniky je prostorová orientace bakterií, kdy je nemožné připravit vzorek tak, aby byly všechny bakterie vhodně orientovány vůči procházejícímu paprsku elektronů. Z tohoto důvodu byla využita také kryo skenovací elektronová mikroskopie (kryo SEM) poskytující ultrastrukturální zobrazení vzorků v hluboce zamrazeném stavu, díky kterému bylo možno prozkoumat samotnou morfologii PHB granulí. Z takto pořízených snímků bylo patrné, že granule PHB si zachovávají amorfni charakter oproti izolovanému PHB z bakteriálních buněk, který se vyznačuje výhradně krystalickou strukturou. Další z mnoha výhod této techniky je jistě možnost přípravy vzorku různým způsobem, konkrétně předchlazení vzorků různou rychlostí na různou teplotu před šokovým zmrazením. V experimentech této diplomové práce byly vyzkoušeny tři různé teploty předchlazení – laboratorní teploty, -10 °C a -30 °C, avšak na snímcích nebyly patrné žádné odlišnosti. Poslední mikroskopická technika, která byla použita v této dílčí experimentální části diplomové práce je mikroskopie atomárních sil (AFM) charakterizující topografii jednotlivých bakterií. Ve srovnání s již zmíněnými mikroskopickými technikami, velkou výhodou AFM je její neinvazivní pozorování povrchu bakterií, rychlá příprava vzorků a také rychlé naměření jednotlivých skenů.

S morfologickými změnami bakterií rovněž souvisí i změny jejich mechanických vlastností (odolnost vůči mechanickým deformacím), kdy příčiny těchto změn mohou souviset s mírou hydratace nebo množstvím intracelulární vody v závislosti na stresovou odpověď mikroorganismů. Konkrétně byly porovnávány viskoelastické vlastnosti prostřednictvím oscilačních testů (deformační, teplotní rampa) metodou reologie, kdy bylo zapotřebí tuto metodu nejen otestovat, ale i optimalizovat na vzorky bakteriálních kmenů *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup>, u nichž byly stanoveny mechanické vlastnosti bakteriálních kultur v závislosti na teplotě či měnící se amplitudě deformace s ohledem na přítomnost polymeru (*C. necator* H16 kultivovaný v minerálním médiu) či druhu kultivačního média. Z výsledků měření je patrné, že u vzorků bakteriálních kultur bez ohledu na produkci PHB polymeru převládá elastický charakter deformace. Po dosažení určité hodnoty amplitudy deformace (cca 10 %), se u vzorků začíná s rostoucí deformací zvyšovat podíl viskózního charakteru. Uvedené výsledky byly dosaženy pro teplotu 0 °C. Odlišnosti mezi buňkami s resp. bez granulí PHB byly nalezeny v celkové tuhosti vzorku, charakterizované hodnotou komplexního modulu.

Tento fakt naznačuje, že granule PHB zastávají též funkci opornou. Dále byl experimentálně ověřen minimální efekt kultivačního média na viskoelastické chování bakterií, čímž byly potvrzeny předešlé experimenty zaměřené na vliv přítomnosti PHB polymeru. Výsledky provedených experimentů byly též vyneseny v závislost ztrátového úhlu na vzrůstající amplitudě deformace, kdy se charakter vzorků s PHB polymerem nijak nelišil od vzorků bez přítomného PHB polymeru. U všech vzorků převládal především elastický charakter deformace. Tudíž lze konstatovat, že přítomnost PHB v bakteriích zvyšuje celkovou tuhost vzorku, nikoliv charakter jeho deformace. Další experimenty byly provedeny v závislosti na vzrůstající amplitudě deformace při konstantních teplotách - 0 °C, -5 °C, -10 °C. Při záporných hodnotách teplot docházelo k nižší reprodukovatelnosti hodnot, a to pravděpodobně důsledkem částečného zmrznutí vody ve vzorku. Nicméně i přesto, výsledky při teplotě -5 °C naznačují zvýšení celkové tuhosti vzorku s ohledem na hodnoty komplexního modulu při teplotě -5 °C ve srovnání s hodnotami komplexního modulu měřeného při teplotě 0 °C.

Poslední experimenty realizované prostřednictvím oscilačních reologických testů probíhaly za konstantní amplitudy deformace při měnící se teplotě v rámci dvou cyklů, kdy docházelo při určité teplotě ke skokovému zvýšení komplexního modulu charakterizující zmrznutí vody ve vzorku. Oproti strmému skoku hodnot komplexního modulu v průběhu mrznutí, který byl v jednotlivých cyklech zaznamenán při rozdílné teplotě, zpětný pokles hodnot komplexního modulu v rámci tání byl pozvolný a reprodukovatelný. To potvrzuje, že tání je na rozdíl od krystalizace proces rovnovážný neovlivněný do takové míry kinetickými efekty. Z velkého množství provedených experimentů byl potvrzen rozsáhlý potenciál využití reologie v oblasti biologických vzorků.

Další skupina metod, které byly využity v této diplomové práci, představovala termická analýza umožňující sledovat fázové přeměny vody ve vzorcích bakteriálních kultur *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup>, kultivovaných v minerálním médiu. Konkrétně byla využita teplotně modulovaná diferenční skenovací kalorimetrie, pomocí které se charakterizovaly fázové přechody intracelulární vody během chlazení a zpětného zahřívání jednotlivých vzorků. Výhodou této metody je schopnost oddělení celkového naměřeného toku na signál vratných a nevratných dějů, kdy byl prokázán ireverzibilní charakter procesu mrznutí intracelulární vody. Vzorky obsahující polymer PHB se vyznačovaly větší reversibilitou procesu tání, přičemž příčina toho rozdílu je přisuzována rozdílné hydrataci buněčných komponent, kdy se předpokládá větší hydratace u vzorku bakteriální kultury neobsahující PHB polymer (*C. necator* PHB<sup>-4</sup>).

Další experimenty v rámci termické analýzy byly provedeny prostřednictvím termogravimetrické analýzy za účelem charakterizace průběhu sušení vzorků bakteriální kultury *C. necator* H16 (produkce PHB) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (bez produkce PHB). V rámci dynamických experimentů (teplotní rampa) se pokles hmotností všech vzorků dočasně zastavil při teplotě cca 200 °C, což odpovídá odstranění veškeré vody ze vzorku. K úbytku hmotnosti, reprezentující spalování organické hmoty, docházelo v rozsahu teplot od 300 do 600 °C, s tím, že ke spalování PHB docházelo v oblasti nižších teplot (PHB představuje termicky labilní

organickou složku buněk). Dále byly provedeny experimenty zaměřené na izotermické sušení vzorku při 60 °C. Tyto experimenty umožnily rozdělení celkového množství vody ve vzorku na extracelulární a intracelulární vodu.

Poslední metoda, která byla navrhována a optimalizována na tento typ vzorků, bylo použití dynamického a elektroforetického rozptylu běžně využívaný v rámci charakterizace koloidních systémů. Pomocí kombinace již zmíněných rozptylů světla při měnícím se pH byla zjištěna hodnota izoelektrického bodu membrán bakterií pomocí naměřeného zeta potenciálu a potvrzena agregace bakterií prostřednictvím distribuce velikosti částic. Přitom hodnoty izoelektrických bodů vzorků bakteriálních kultur se nijak nelišily s ohledem na přítomnost polymeru PHB. Na rozdíl od velikosti agregátů, kde vzorky obsahující polymer PHB dosahovaly až 5 000 nm, zatímco velikost agregátu vzorků bez PHB polymeru byla stanoveny kolem hodnoty 1 200 nm. Stejných hodnot bylo rovněž dosaženo i ve vzorcích rozdílných bakteriálních kultur, tudíž lze konstatovat, že polymer PHB má minimální vliv jak na povrchový náboj, tak na agregaci bakterií oproti kultivačním podmínkám.

V této diplomové práci byl potvrzen vysoký potenciál využití vybraných fyzikálně-chemických analýz při studiu stresové odpovědi bakteriálních buněčných kmenů. V rámci experimentální části práce byly techniky úspěšně optimalizovány nejen z hlediska vlastního měření, ale i co se týče samotné přípravy nebo předúpravy vzorků. Dá se předpokládat, že testované techniky se v optimalizovaném provedení stanou cenným metodickým aparátem v navazujících experimentech, zaměřených na stanovení konkrétních stresových odpovědí studovaných mikrobiálních systémů.

## 6 LITERATURA

- [1] JUNGWIRTH, Pavel. *Water, Water All Around. CHEMICKE LISTY*, 2008, 102.4: 227.
- [2] MAZUR, Peter. Principles of cryobiology. *Life in the frozen state*, 2004, 672.
- [3] CHAPLIN, Martin. Water structure and science. *Water Anomalies* In: <http://www.lsbu.ac.uk/water/anmlies.html>, 2011.
- [4] EISENBERG, David S., et al. *The structure and properties of water*. Oxford: Clarendon Press, 1969.
- [5] ROBINSON, Robert Anthony; STOKES, Robert Harold. *Electrolyte solutions*. Courier Corporation, 2002.
- [6] BALL, Philip. *H2O: A Biography of Water*. Velká Británie: Weidenfeld a Nicolson, 1999. ISBN 978-0-7538-1092-7.
- [7] PINHEIRO, Mario J. *Science2be: Water: a not so simple molecule...* [online]. 2014 [cit. 2016-02-19]. Dostupné z: <https://science2be.wordpress.com/2012/07/23/water-a-not-so-simple-molecule/>
- [8] JEFFREY, George A.; JEFFREY, George A. *An introduction to hydrogen bonding*. New York: Oxford university press, 1997.
- [9] HEADRICK, Jeffrey M., et al. Spectral signatures of hydrated proton vibrations in water clusters. *Science*, 2005, 308.5729: 1765-1769.
- [10] HOBZA, P.: *Nekovalentní interakce s přímou participací vodíku: vodíková vazba, nepravá vodíková vazba a dvouvodíková vazba*. Chem. Listy. 2008, č. 102.
- [11] BOJKOVSKÝ, Martin. Termodynamika: *Vodíková vazba. Termodynamika* [online]. 2009 [cit. 2013-06-26]. Dostupné z WWW: <[http://fikus.omska.cz/~bojkovsm/termodynamika/vodikova\\_vazba.html](http://fikus.omska.cz/~bojkovsm/termodynamika/vodikova_vazba.html)>.
- [12] KAWAHARA, Hidehisa. *Characterizations of Functions of Biological Materials Having Controlling-Ability Against Ice Crystal Growth*. INTECH Open Access Publisher, 2013.
- [13] KLOTZ, Irving M.; FRANZEN, James S. *Hydrogen bonds between model peptide groups in solution*. Journal of the American Chemical Society, 1962, 84.18: 3461-3466.
- [14] SCHELLMAN, John A. *Temperature, stability, and the hydrophobic interaction*. Biophysical journal, 1997, 73.6: 2960.

- [15] COOPER, Terrance G.; COOPER, T. G. The tools of biochemistry. 1977.
- [16] GOLDSTEIN, Joseph, et al. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis: a text for biologists, materials scientists, and geologists. Springer Science & Business Media, 2012.
- [17] SUN, Wendell Q. *State and Phase Transition Behaviors of Quercus rubra Seed Axes and Cotyledonary Tissues: Relevance to the Desiccation Sensitivity and Cryopreservation of Recalcitrant Seeds*. Cryobiology, 1999, 38.4: 372-385.
- [18] APGAR, Martin E.; HULTIN, Herbert O. Lipid peroxidation in fish muscle microsomes in the frozen state. *Cryobiology*, 1982, 19.2: 154-162.
- [19] MAZUR, Peter. *Cryobiology: the freezing of biological systems*. Science, 1970, 168.3934: 939-949.
- [20] MULDREW, Ken, et al. The water to ice transition: implications for living cells. *Life in the frozen state*, 2004, 67-108
- [21] DEBENEDETTI, Pablo G. *Supercooled and glassy water*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2003, 15.45: R1669.
- [22] TONER, Mehmet; CRAVALHO, Ernest G.; KAREL, Marcus. *Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells*. Journal of Applied Physics, 1990, 67.3: 1582-1593.
- [23] CALLOW, R. A.; MCGRATH, J. J. Thermodynamic modeling and cryomicroscopy of cell-size, unilamellar, and paucilamellar liposomes. *Cryobiology*, 1985, 22.3: 251-267.
- [24] MAZUR, Peter. *Freezing of living cells: mechanisms and implications*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 1984, 247.3: C125-C142.
- [25] SINCLAIR, Brent J.; RENAULT, David. *Intracellular ice formation in insects: Unresolved after 50years?*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2010, 155.1: 14-18.
- [26] WENG, Lindong, et al. *Molecular dynamics study of effects of temperature and concentration on hydrogen-bond abilities of ethylene glycol and glycerol: implications for cryopreservation*. The Journal of Physical Chemistry A, 2011, 115.18: 4729-4737.
- [27] SEKI, Shinsuke; KLEINHANS, F. W.; MAZUR, Peter. *Intracellular ice formation in yeast cells vs. cooling rate: predictions from modeling vs. experimental observations by differential scanning calorimetry*. Cryobiology, 2009, 58.2: 157-165.

- [28] MAZUR, Peter; SCHMIDT, Janice J. *Interactions of cooling velocity, temperature, and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeast*. *Cryobiology*, 1968, 5.1: 1-17.
- [29] NEI, Tokio. *Structure and function of frozen cells: freezing patterns and post-thaw survival*. *Journal of microscopy*, 1978, 112.2: 197-204.
- [30] STEPONKUS, Peter L. *Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation*. *Annual Review of Plant Physiology*, 1984, 35.1: 543-584.
- [31] FULLER, Barry J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*, 2004, 25.6: 375-388.
- [32] HUBÁLEK, Zdenek. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 2003, 46.3: 205-229
- [33] SCUDELLARI, Megan. TheScientist. *Freezing Cells* [online]. 2013 [cit. 2016-03-23]. Dostupné z: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/34223/title/Freezing-Cells/>
- [34] HOLOVATI, Jelena L.; GYONGYOSSY-ISSA, Maria IC; ACKER, Jason P. *Effects of trehalose-loaded liposomes on red blood cell response to freezing and post-thaw membrane quality*. *Cryobiology*, 2009, 58.1: 75-83.
- [35] FAHY, Gregory M. *Cryoprotectant toxicity neutralization*. *Cryobiology*, 2010, 60.3: S45-S53.
- [36] KULESHOVA, Lilia L.; LOPATA, Alex. *Vitrification can be more favorable than slow cooling*. *Fertility and sterility*, 2002, 78.3: 449-454.
- [37] ROLLETT, Anthony, et al. *Recrystallization and related annealing phenomena*. Elsevier, 2004.
- [38] MORGAN-SAGASTUME, Fernando, et al. Production of polyhydroxyalkanoates in open, mixed cultures from a waste sludge stream containing high levels of soluble organics, nitrogen and phosphorus. *water research*, 2010, 44.18: 5196-5211.
- [39] REINECKE, Frank; STEINBÜCHEL, Alexander. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 2008, 16.1-2: 91-108.
- [40] CRAMM, Rainer. Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 2008, 16.1-2: 38-52.

- [41] POHLMANN, Anne, et al. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature biotechnology*, 2006, 24.10: 1257-1262.
- [42] SCHWARTZ, Edward, et al. Complete nucleotide sequence of pHG1: a *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H<sub>2</sub>-based lithoautotrophy and anaerobiosis. *Journal of molecular biology*, 2003, 332.2: 369-383.
- [43] OBRUČA, Stanislav. Controlled production and degradation of selected biomaterials. *Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická*, 2010.
- [44] STEINBÜCHEL, Alexander; VALENTIN, Henry E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 128.3: 219-228.
- [45] RON, Eliora Z. Bacterial stress response. In: *The prokaryotes*. Springer New York, 2006. p. 1012-1027.
- [46] BOOR, Kathryn J. Bacterial stress responses: what doesn't kill them can make them stronger. *PLoS biology*, 2006, 4.1.
- [47] AYUB, Nicolás D., et al. A polyhydroxybutyrate-producing *Pseudomonas* sp. isolated from Antarctic environments with high stress resistance. *Current microbiology*, 2004, 49.3: 170-174.
- [48] SARDESAI, Nagesh; BABU, Cherukeri Raghavendra. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism is affected by changes in respiratory enzymatic activities due to cold stress in two psychrotrophic strains of *Rhizobium*. *Current microbiology*, 2001, 42.1: 53-58.
- [49] ZHAO, Yan Hong, et al. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS microbiology letters*, 2007, 276.1: 34-41.
- [50] SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in polymer science*, 2000, 25.10: 1503-1555.
- [51] PHILIP, S.; KESHAVARZ, Tajalli; ROY, Ipsita. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2007, 82.3: 233-247.
- [52] TISO, Till; WIERCKX, Nick; BLANK, L. Non-pathogenic *Pseudomonas* as platform for industrial biocatalysis. *Industrial biocatalysis. Pan Stanford, Singapore*, 2014, 323-372.
- [53] REDDY, C. S. K., et al. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource technology*, 2003, 87.2: 137-146.



- [54] KESHAVARZ, Tajalli; ROY, Ipsita. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current opinion in microbiology*, 2010, 13.3: 321-326.
- [55] GOGOLEWSKI, S., et al. Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly (3-hydroxybutyrate)(PHB), and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHB/VA). *Journal of biomedical materials research*, 1993, 27.9: 1135-1148.
- [56] ZHAO, Qiang, et al. Crystallization behavior and biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (ethylene glycol) multiblock copolymers. *Polymer degradation and stability*, 2006, 91.6: 1240-1246.
- [57] OBRUCA, S., et al. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly (3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia microbiologica*, 2010, 55.1: 17-22.
- [58] OBRUCA, Stanislav, et al. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29.12: 2417-2428.
- [59] MORI, Shoji, et al. Calorimetric measurement of water transport and intracellular ice formation during freezing in cell suspensions. *Cryobiology*, 2012, 65.3: 242-255.
- [60] CLARKE, Andrew, et al. A low temperature limit for life on Earth. *PLoS One*, 2013, 8.6: e66207.
- [61] GMELIN, Eberhard. Classical temperature-modulated calorimetry: A review. *Thermochimica acta*, 1997, 304: 1-26.
- [62] HÖHNE, Günther; HEMMINGER, Wolfgang F.; FLAMMERSHEIM, H.-J. *Differential scanning calorimetry*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [63] DOMÍNGUEZ-DÍAZ, Maraolina; ROMO-URIBE, Angel. Viscoelastic behavior of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Bioinspired Biomim Nanobiomaterials*, 2012, 1: 214-220
- [64] HOROWITZ, Hugh H.; METZGER, Gershon. A New Analysis of Thermogravimetric Traces. *Analytical Chemistry*, 1963, 35.10: 1464-1468.
- [65] SUN, Jingru, et al. Study on crystalline morphology of poly (L-lactide)-poly (ethylene glycol) diblock copolymer. *Polymer*, 2004, 45.17: 5969-5977.
- [66] EHRENSTEIN, Gottfried Wilhelm. *Polymeric materials: structure, properties, applications*. Carl Hanser Verlag GmbH Co KG, 2012.
- [67] DOI, Yoshiharu, et al. *Rheology: principles, measurements, and applications*. 1994.

- [68] SEKI, Shinsuke; KLEINHANS, F. W.; MAZUR, Peter. Intracellular ice formation in yeast cells vs. cooling rate: predictions from modeling vs. experimental observations by differential scanning calorimetry. *Cryobiology*, 2009, 58.2: 157-165.
- [69] DEVIREDDY, Ramachandra V.; RAHA, Debopam; BISCHOF, John C. Measurement of water transport during freezing in cell suspensions using a differential scanning calorimeter. *Cryobiology*, 1998, 36.2: 124-155.
- [70] MEGEED, Zaki; CAPPELLO, Joseph; GHANDEHARI, Hamidreza. Thermal analysis of water in silk-elastinlike hydrogels by differential scanning calorimetry. *Biomacromolecules*, 2004, 5.3: 793-797.
- [71] MA, Qian; GEORGIEV, Georgi; CEBE, Peggy. Constraints in semicrystalline polymers: Using quasi-isothermal analysis to investigate the mechanisms of formation and loss of the rigid amorphous fraction. *Polymer*, 2011, 52.20: 4562-4570.
- [72] KVÍTEK, Libor; PANÁČEK, Aleš. *Základy koloidní chemie*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2007.
- [73] OSTLE, Anthony G.; HOLT, J. G. Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 44.1: 238-241.
- [74] JENDROSSEK, Dieter. Fluorescence microscopical investigation of poly (3-hydroxybutyrate) granule formation in bacteria. *Biomacromolecules*, 2005, 6.2: 598-603.
- [75] OBRUČA, Stanislav, et al. How accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing. *PLOS ONE*, 2016, přijato do recenzního řízení.
- [76] GE, Haiyan, et al. Fracture behavior of colloidal polymer particles in fast-frozen suspensions viewed by cryo-SEM. *Macromolecules*, 2006, 39.16: 5531-5539.
- [77] MRAVEC, Filip, et al. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, fnw094.
- [78] ZHOU, Yangxin; HU, Liangbing; GRÜNER, George. A method of printing carbon nanotube thin films. *Applied Physics Letters*, 2006, 88.12: 123109.
- [79] BORIONETTI, G.; BAZZALI, A.; ORIZIO, R. Atomic force microscopy: a powerful tool for surface defect and morphology inspection in semiconductor industry. *The European Physical Journal Applied Physics*, 2004, 27.1-3: 101-106.
- [80] BALANDIN, Alexander A., et al. Superior thermal conductivity of single-layer graphene. *Nano letters*, 200

- [81] DUFRÊNE, Yves F. Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology. *Current opinion in microbiology*, 2003, 6.3: 317-323.
- [82] MÜLLER, Daniel J.; DUFRENE, Yves F. Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. *Nature nanotechnology*, 2008, 3.5: 26
- [83] LYUBCHENKO, Yuri L.; SHLYAKHTENKO, Luda S. AFM for analysis of structure and dynamics of DNA and protein–DNA complexes. *Methods*, 2009, 47.3: 206-213.
- [84] ALCAZAR, E. B.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; DWECK, J. Yeast intracellular water determination by thermogravimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2000, 59.3: 643-648.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

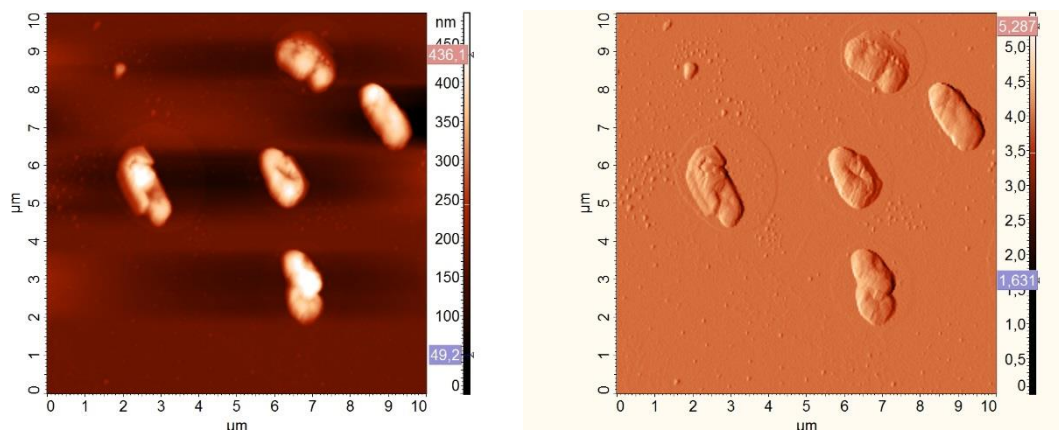
### 7.1 Použité zkratky

PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
PHA	polyhydroxyalkanoáty
NMR	nukleární magnetická resonance
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
CPA	kryoprotektivní látky
PEG	polyetylenglykol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast
3HV	3-hydroxyvalerát
3HHx	3-hydroxyhexanoát
kryo-SEM	kryo skenovací elektronová mikroskopie
TGA	termogravimetrická analýza
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
AFM	mikroskopie atomárních sil
QITMDSC	kvazi izotermická teplotně modulovaná diferenční skenovací kalorimetrie
DLS	dynamický rozptyl světla
ELS	elektroforetický rozptyl světla
NB	Nutrient Broth
MM	minerální médium
SPM	skenovací sondová mikroskopie

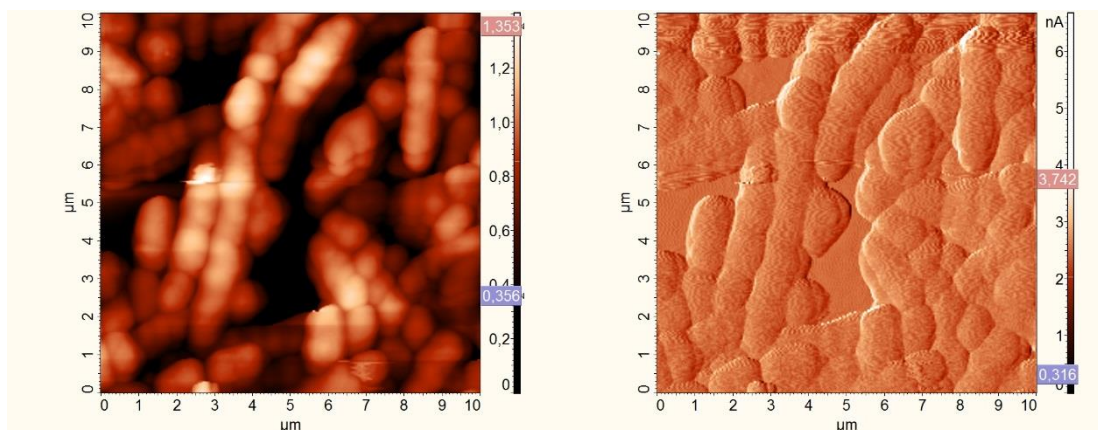
## 7.2 Použité symboly

<i>Symbol</i>	<i>Význam symbolu</i>	<i>Jednotka</i>
$T$	teplota	K
$d$	délka	m
$V$	objem	$\text{m}^3$
$\nu$	frekvence	Hz
$H$	entalpie	J
$S$	entropie	$\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$
$G'$	elastický modul	Pa
$G''$	viskózní modul	Pa
$G$	Gibbsova energie	J
$\delta$	ztrátový úhel	$[\circ]$
$C$	tepelná kapacita	$\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$
$\gamma$	povrchové napětí	$\text{N} \cdot \text{m}^{-3}$
$\tau$	čas	s

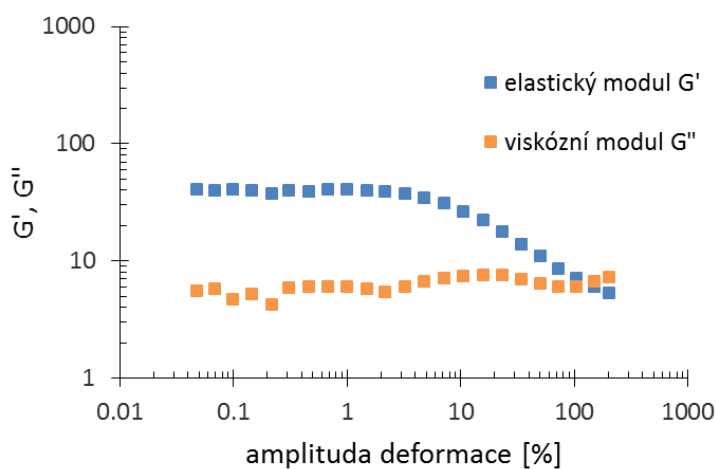
## 8 PŘÍLOHY



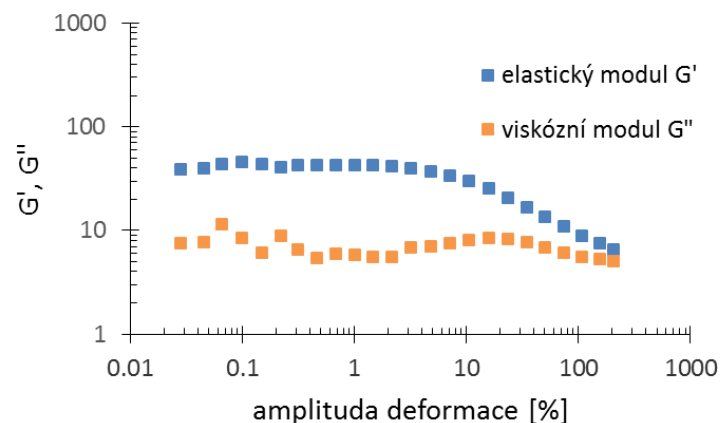
**Obrázek 39** Snímky bakterií *C. necator* H16 kultivovaných v Nutrient Broth médiu, kde topografické snímky jsou vlevo a amplitudové snímky vpravo.



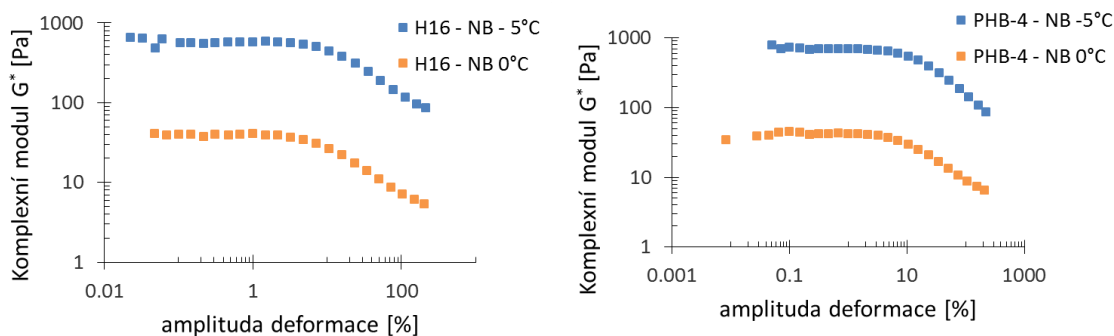
**Obrázek 40** Snímky bakterií *C. necator* H16 kultivovaných v minerálním médiu, kde topografické snímky jsou vlevo a amplitudové snímky vpravo.



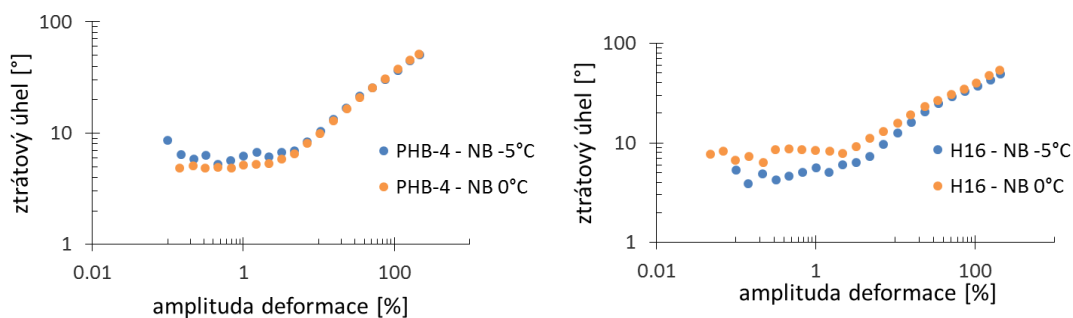
**Obrázek 41** Závislost viskoelastických vlastností bakterií *C. necator* H16 NB na velikosti amplitudy deformace za teploty 0 °C.



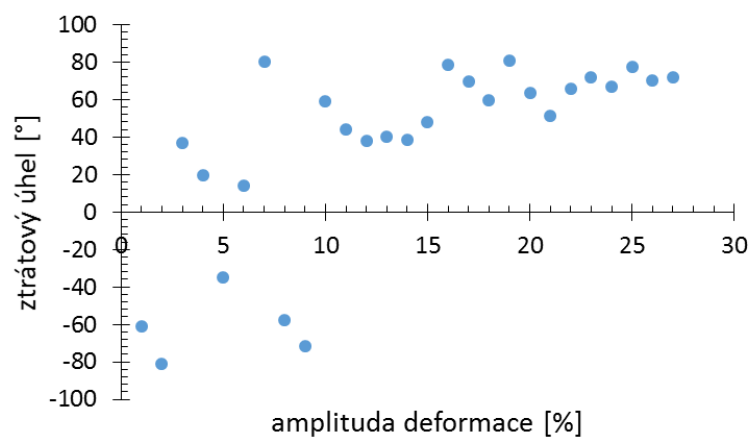
**Obrázek 42** Závislost viskoelastických vlastností bakterií *C. necator* PHB<sup>-4</sup> NB na velikosti amplitudy deformace za teploty 0 °C.



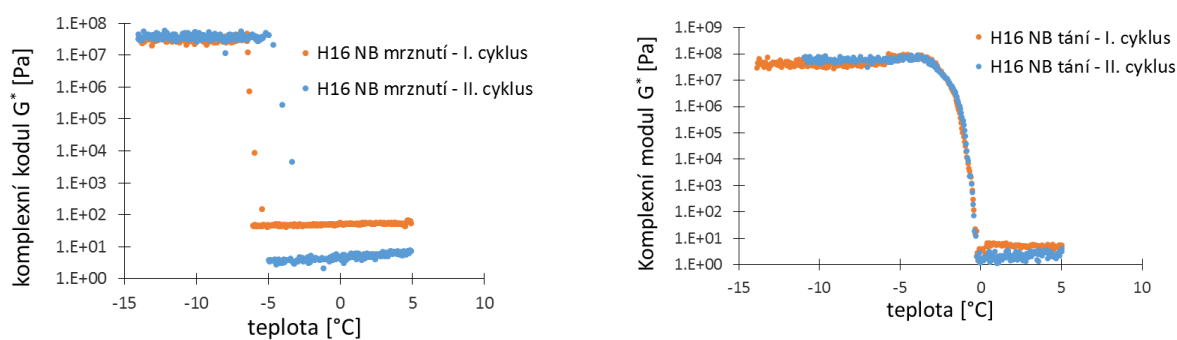
**Obrázek 43** Srovnání naměřených komplexních modulů bakteriální kultury *C. necator* H16 (vlevo) a bakteriální kultury *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (vpravo) kultivovaných v Nutrient Broth médiu při teplotě 0 °C a -5 °C.



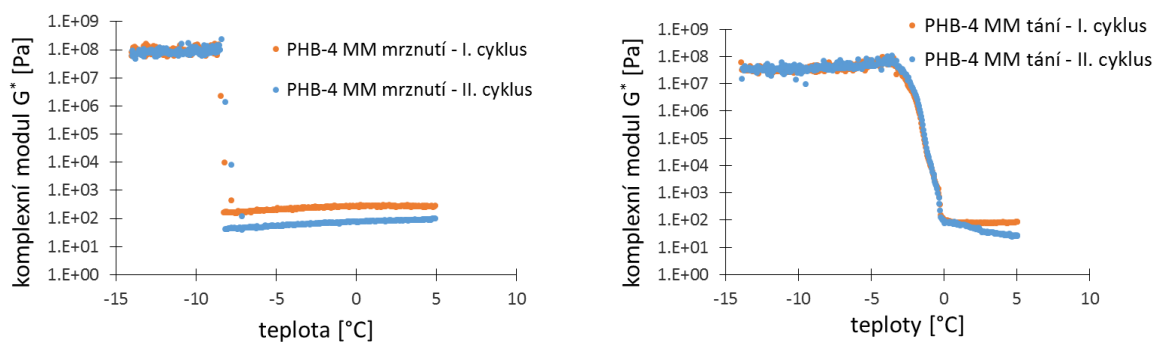
**Obrázek 44** Porovnání viskózních a elastických charakterů bakteriálního kmene *C. necator* H16 (vlevo) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (vpravo) kultivovaných v Nutrient Broth médiu naměřených při teplotě 0 °C a -5 °C.



**Obrázek 45** Elastickoviskózní charakter bakteriálního kmene *C. necator* kultivovaný v minerálním médiu naměřený při teplotě  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

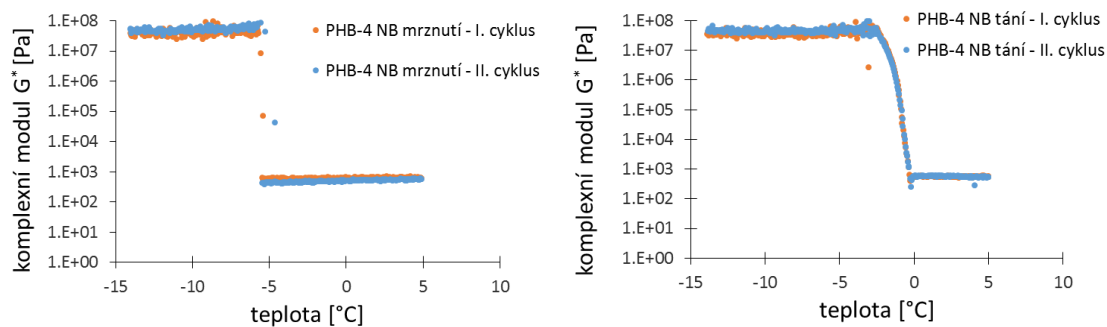


**Obrázek 46** Porovnání změn komplexního modulu bakteriálního kmene *C. necator* H16 kultivovaného v Nutrient Broth médiu v průběhu mrznutí (vlevo) a tání jednotlivých cyklů (vpravo).

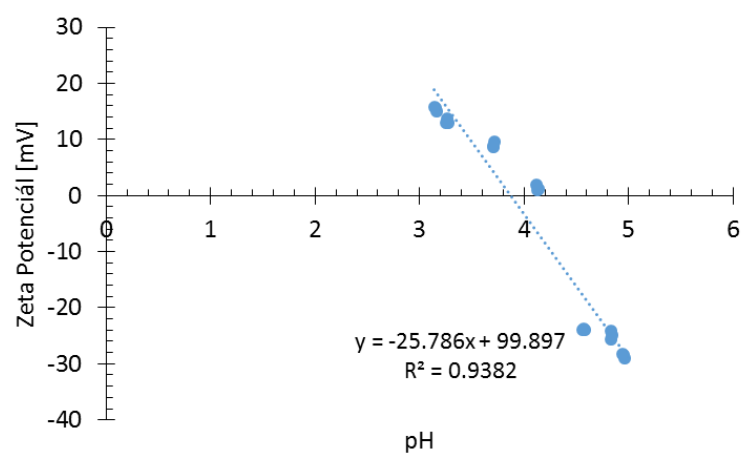


**Obrázek 47** Porovnání změn komplexního modulu bakteriálního kmene *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaného v minerálním médiu v průběhu mrznutí (vlevo) a tání jednotlivých cyklů (vpravo).

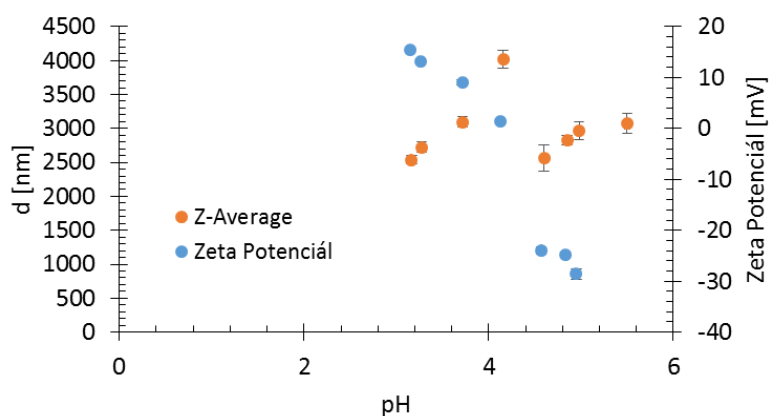




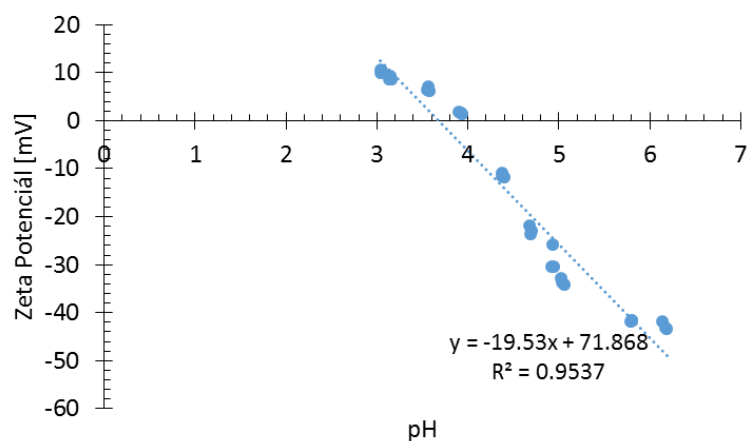
**Obrázek 48** Porovnání změn komplexního modulu bakteriálního kmene *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaného v Nutrient Broth médiu v průběhu mrznutí (vlevo) a tání jednotlivých cyklů (vpravo).



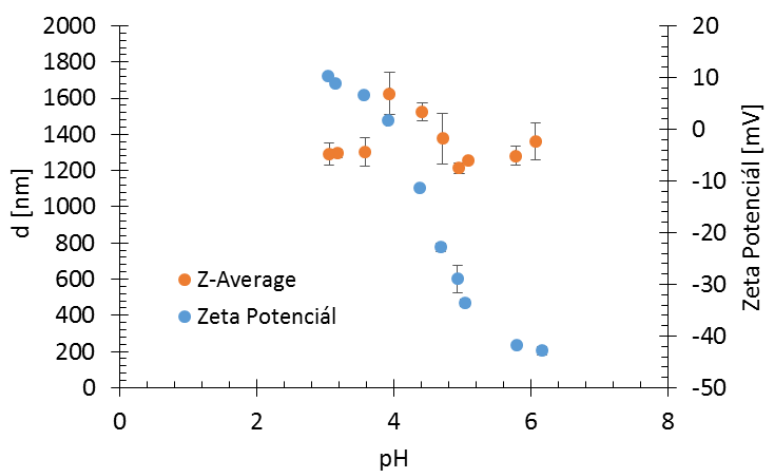
**Obrázek 49** Stanovení izoelektrického bodu suspenze *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivované v minerálním médiu



**Obrázek 50** Agregace buněk *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných v minerálním médiu za izoelektrického bodu.



**Obrázek 51** Stanovení izoelektrického bodu suspenze *C. necator* PHB<sup>4</sup> kultivované v médiu Nutrient Broth.



**Obrázek 52** Agregace buněk *C. necator* PHB<sup>4</sup> kultivovaných v Nutrient Broth médiu za izoelektrického bodu.